

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE  
UNIDADE ACADÊMICA DE EDUCAÇÃO

FRANCIELLY NEGREIROS DE ARAÚJO

**GENES *PR-5*: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR *IN SILICO* E  
EXTRAÇÃO DE DNA DE PLANTAS DO SEMIÁRIDO PARA  
ISOLAMENTO POR PCR**

CUITÉ – PB

2014

FRANCIELLY NEGREIROS DE ARAÚJO

**GENES *PR-5*: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR *IN SILICO* E  
EXTRAÇÃO DE DNA DE PLANTAS DO SEMIÁRIDO PARA  
ISOLAMENTO POR PCR**

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito obrigatório para obtenção do Grau de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Magnólia de Araújo Campos.

CUITÉ – PB

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE  
Responsabilidade Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

A663g Araújo, Francielly Negreiros de.

Genes *PR5*: caracterização molecular *in silico* de extração de DNA de plantas do semiárido para isolamento por PCR. / Francielly Negreiros de Araújo. – Cuité: CES, 2014.

51 fl.

Monografia (Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2014.

Orientadora: Dra. Magnólia de Araújo Campos.

1. Caatinga. 2. Bioinformática. 3. CTAB. I. Título.

CDU 504.75

FRANCIELLY NEGREIROS DE ARAÚJO

**GENES *PR-5*: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR *IN SILICO* E EXTRAÇÃO DE  
DNA DE PLANTAS DO SEMIÁRIDO PARA ISOLAMENTO POR PCR**

Aprovada em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Magnólia de Araújo Campos (Orientadora)

---

Dr.<sup>a</sup> Liziane Maria de Lima

---

Prof. Dr. Marcus José Conceição Lopes

## DEDICATÓRIA

*Aos meus queridos pais Josefa Negreiros e João Batista,  
pelo apoio e amor incondicional.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, minha fortaleza, por guiar cada um dos meus passos, mantendo-me sempre na direção certa.

À minha amada família, pela motivação constante e amor incondicional, em especial a minha mãezinha, sempre compreensiva e acolhedora, minha confidente, meu amor maior. Tens a capacidade de enxergar o que a de melhor em mim.

À Dr.<sup>a</sup> Magnólia Campos, pela orientação, incentivo, amizade, pela oportunidade de estagiar no Laboratório de Biotecnologia do CES, e por me ensinar o significado da persistência e os frutos que vem com ela.

À Universidade Federal de Campina Grande, pela oportunidade de realização do curso e aos professores que compõe o corpo docente do curso de Ciências Biológicas, pelo aprendizado e dedicação ao longo desses 4 anos, todos contribuíram significativamente para minha formação acadêmica e pessoal. Aos servidores do CES em geral, pelo ótimo atendimento e disposição de ajudar sempre que preciso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

Aos membros da banca examinadora, Dr.<sup>a</sup> Liziane Maria e Prof.<sup>o</sup> Dr. Marcus Lopes, pela disposição em contribuir para o enriquecimento deste trabalho.

À todos os meus amigos do curso de Ciências Biológicas, em especial as minhas amigas-irmãs Alexandra Pereira, Thamara Azevedo e Carla Danielle pelo companheirismo e conhecimentos compartilhados no decorrer do curso, mas principalmente pela amizade e apoio mútuo que nos levou a concretização de um sonho. Não podia deixar de agradecer a mãe de Thamara, Natália, por todo carinho, acolhimento e ajuda nos momentos difíceis.

Em especial também, a minha amiga Ana Luiza Guedes Correia, por quem tenho uma grande admiração, pois sei de suas lutas e conquistas diárias, és uma guerreira. Você me ensinou muito neste tempo de convivência, foram muitas experiências compartilhadas, dificuldades superadas, com você aprendi a ser mais independente.

Às minhas amigas do Laboratório de Biotecnologia, Larissa Cavalcante, Graciete Balbino, Larissa Thuane e Rayane Abreu por fazerem os meus dias de trabalho no laboratório mais felizes e produtivos, aprendi muito com cada uma de vocês. Obrigada pelo ótimo trabalho em equipe.

Às alunas do Programa de Pós-graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia, Larissa Cavalcante, Cláudia Ramos e Ana Paula pela ajuda, amizade e disponibilidade de ajudar-me sempre que necessário. Por todos os finais de semana sacrificados para estarem comigo no laboratório, serei eternamente grata.

Às técnicas dos laboratórios de Biologia, Ana Paula e Fernanda, por terem gentilmente disponibilizado equipamentos necessários para a realização dos experimentos.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação acadêmica e finalização desta pesquisa.

## EPÍGRAFE

*“A vida é um rio de DNA que corre ao longo do tempo, conectando todos os organismos passados e presentes”.*

*Richard Darwin*



## RESUMO

A busca por novos genes antifúngicos *PR-5* desperta interesse em possíveis aplicações biotecnológicas na agricultura e saúde para controlar doenças fúngicas. Neste sentido, plantas de Caatinga representam uma fonte rica de recursos genéticos pouco explorados. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização molecular *in silico* de genes do tipo *PR-5* e a extração de DNA de plantas do semiárido paraibano, visando à amplificação por PCR. Para isso, foram extraídos DNAs genômicos de 16 plantas coletadas no Horto Florestal Olho D'água da Bica e no CES/UFCEG, utilizando os protocolos de extração CTAB e SDS. Para algumas espécies, a extração de DNA com o protocolo CTAB mostrou-se mais eficiente, porém com contaminação por carboidratos, RNA e degradação. O uso do protocolo SDS foi eficaz para a obtenção de amostras livres de contaminação por proteínas. A quantidade e qualidade dos DNAs extraídos variaram de acordo com os tecidos vegetais das diferentes espécies, com os protocolos e com os métodos de análises por eletroforese e espectrofotometria. Ensaios preliminares para amplificação dos DNAs por PCR realizados com duas combinações de primers específicos para genes *PR-5* não foram bem-sucedidos, provavelmente, em função da viabilidade dos primers utilizados do que da qualidade e quantidade dos DNAs extraídos. A ausência de depósitos no GenBank de genes *PR-5* das espécies vegetais de Caatinga estudadas revelou a necessidade desse estudo de prospecção. Análises comparativas *in silico* de sequências de nucleotídeos e de proteínas *PR-5* são fundamentais para o desenho de primers específicos funcionais.

**Palavras-Chaves:** Caatinga. Proteínas relacionadas a patogênese. CTAB. Bioinformática.

## ABSTRACT

The search for new antifungal *PR-5* genes is interesting due to possible biotechnological applications in agricultural and health to control fungal diseases. In this context, Caatinga plants represent a rich source of genetic resources unexploited. The aim of this work was to perform the *in silico* molecular characterization of *PR-5* genes and to extract DNA from Paraiba Semiarid plants genome, aiming PCR amplification. Hence, genomic DNAs were isolated from 16 plants collected from Caating Forest garden Olho D'água da Bica and the CES/UFCG, by using the CTAB and SDS protocols. The quantity and quality of extracted DNA varied according to species plant tissue, the protocols and methods used to analyze, electrophoresis and spectrophotometry. For some species, the DNA extraction by CTAB protocol revealed is more efficient, however carbohydrates and RNA contaminations and also degradations were observed. The use of SDS protocol is also efficient for obtaining of free contamination samples with proteins. Preliminary assays for DNA amplification by PCR were performed using two combinations of specific primers for *PR-5* genes, but unsuccessful, probably more due to viability of utilized primers than quality and quantity of extracted DNAs. The absence of deposits in GenBank of *PR-5* genes from studied plant species of the Caatinga revealed the need for this prospective study. Comparative *in silico* analysis of nucleotide and *PR-5* proteins sequences are fundamental to the design of specific primers functional.

**Keywords:** Caatinga. Pathogenesis-Related Proteins. CTAB. Bioinformatic.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Vista aérea parcial do Horto Florestal Olho D'água da Bica, CES/UFMG.  
 Fonte: Google imagens ..... 27
- Figura 2: Ilustração de espécies cujo DNA foi extraído. **(A)** Algaroba (*Prosopis juliflora*); **(B)** Azeitona Roxa (Azeitona Roxa); **(C)** Baraúna (*Schinopsis brasiliensis*); **(D)** Umbu (*Phytolacca dioica L*); **(E)** Canafístula (*Senna spectabilis*); **(F)** Caju (*Anacardium occidentale L*); **(G)** Catingueira (*Caesalpinia pyramidalis*); **(H)** Feijão Bravo (*Capparis flexuosa L*); **(I)** Juazeiro (*Ziziphus joazeiro*); **(J)** Jurubeba (*Solanum paniculatum*); **(L)** Jurema Preta (*Mimosa tinuiflora*); **(M)** Laranja (*Citrus aurantium*); **(N)** Mulungu (*Erythrina mulungu*); **(O)** Pinha (*Annona Squamosa*); **(P)** Limãozinho (*Zanthoxylum stelligerum*); **(Q)** Romã (*Punica granatum*) ..... 28
- Figura 3: **(A)** Material utilizado para a extração de DNA genômico; **(B)** Processo de lise química e mecânica das células do tecido foliar; **(C)** Visualização do novelo de DNA da espécie *Mimosa tinuiflora* ..... 30
- Figura 4: Equipamento de eletroforese horizontal ..... 32
- Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 1% dos DNAs genômicos extraídos pelo protocolo CTAB. Sequência de poços no gel: **1-** Mulungu (*Erythrina mulungu*); **2-** Juazeiro (*Ziziphus joazeiro*); **3-** Romã (*Punica granatum*); **4-** Jurema Preta (*Mimosa tinuiflora*); **5-** Jurubeba (*Solanum paniculatum*); **6-** Catingueira (*Caesalpinia pyramidalis*); **7-** Baraúna (*Schinopsis brasiliensis*); **8-** Azeitona Roxa (*Syzygium cumini*); **9-** Caju (*Anacardium occidentale L*); **10-** Limãozinho (*Zanthoxylum stelligerum*); **11-** Algaroba (*Prosopis juliflora*); **12-** Umbu (*Phytolacca dioica L*); **13-** Canafístula (*Senna spectabilis*); **14-** Pinha (*Annona Squamosa*); **15-** Laranja (*Citrus aurantium*); **16-** Feijão Bravo (*Capparis flexuosa L*) ..... 37

Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 1% dos DNAs genômicos extraídos pelo protocolo SDS. Sequência de poços no gel: **1-** Mulungu (*Erythrina mulungu*); **2-** Juazeiro (*Ziziphus joazeiro*); **3-** Romã (*Punica granatum*); **4-** Jurema Preta (*Mimosa tinuiflora*); **5-** Jurubeba (*Solanum paniculatum*); **6-** Catingueira (*Caesalpinia pyramidalis*); **7-** Baraúna (*Schinopsis brasiliensis*); **8-** Azeitona Roxa (*Syzygium cumini*); **9-** Caju (*Anacardium occidentale L*); **10-** Limãozinho (*Zanthoxylum stelligerum*); **11-** Algaroba (*Prosopis juliflora*); **12-** Umbu (*Phytolacca dioica L*); **13-** Canafístula (*Senna spectabilis*); **14-** Pinha (*Annona Squamosa*); **15-** Laranja (*Citrus aurantium*); **16-** Feijão Bravo (*Capparis flexuosa L*) ..... 37

Figura 7. Demonstração esquemática indicando a posição e direção dos primers utilizados para amplificar a região codificadora de genes *PR-5*, a qual codifica a proteína completa (Peptídeo sinal, região madura e carboxi-terminal). PS, peptídeo sinal (início do gene); CT, carboxi-terminal (final do gene); D, degenerado ..... 40

Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos da PCR teste para diferentes combinações de primers: **1-**PPS1/PCTP1; **2-**PPS1/PPM2; **3-**PPM1/PPM2; **4-**NP1/P5; **5-**NP1/P4; **6-**NP1/JP3R; **7-**NP1/P2R; **8-**NP1/P1R; **9-**AP24/AP24R; **10-**PPM1/P5. Utilizando os DNAs de **1-10:** Jurema Preta; **12-21:** Algaroba; **23-32:** Caju ..... 41

Figura 9. Sequências de nucleotídeo e aminoácidos da PR-5d neutra isolada de *Nicotiana sylvestris* (número de acesso, BAA11180.1). Sombreamento indica a posição de interesse para desenho de *primers*. Sublinhado indica o peptídeo sinal predito pelo programa SignalP, na região N-terminal (início da proteína) e possível peptídeo carboxi-terminal (final da proteína) ..... 42

Figura 10: Alinhamento das sequências de proteínas osmotinas do gênero *Solanum*, usando o programa ClustalW (Version 2.1, <http://www.genome.jp/tools/clustalw/>). Asteriscos indicam aminoácidos idênticos. As 16 cisteínas conservadas em PR-5, envolvidas em oito pontes de sulfeto (C-C), estão indicadas por sombreamento ..... 44

Figura 11: Alinhamento das sequências de nucleotídeos do gênero *Solanum*, usando o programa ClustalW. Asteriscos indicam nucleotídeos idênticos .... 45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Famílias de proteínas PR e suas propriedades químicas .....	20
Tabela 2: Espécies selecionadas para extração de DNA pelos protocolos CTAB e SDS .....	29
Tabela 3: Combinações de primers utilizados nas reações de PCR .....	34
Tabela 4: Quantificação e análise de pureza das amostras de DNA extraído de 16 espécies pelos protocolos CTAB (números ímpares) e SDS (números pares), utilizando leituras de absorvância de 260 e 280 nm. <b>1-2</b> Mulungu; <b>3-4</b> Juazeiro; <b>5-6</b> Romã; <b>7-8</b> Jurema Preta; <b>9-10</b> Jurubeba; <b>11-12</b> Catingueira; <b>13-14</b> Baraúna; <b>15-16</b> Azeitona Roxa; <b>17-18</b> Caju; <b>19-20</b> Limãozinho; <b>21-22</b> Algaroba; <b>23-24</b> Umbu; <b>25-26</b> Canafístula; <b>27-28</b> Pinha; <b>29-30</b> Laranja; <b>31-32</b> Feijão Bravo .....	38
Tabela 4: Distribuição das sequências depositadas no Genbank/NCBI que apresentam similaridade com as sequências de nucleotídeos do gênero <i>Solanum</i> . .....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS

Avr	Avirulência
BLAST	Do inglês, Basic Local Alignment Search Tool
CES	Centro de Educação e Saúde
CTAB	Do inglês, Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo fosfatado
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
ESTs	Expressed Sequence Tags
HR	Hipersensibilidade
ORF	Do inglês, Open Reading Frame
PCR	Do inglês, Reação em Cadeia da Polimerase
Proteínas PR	Do inglês, Pathogenesis-Related
PVP	Do inglês, Polyvinyl Pyrrolidone
R	Resistência
SAR	Resistência Sistêmica Adquirida
SDS	Do inglês, Sodium Dodecyl Sulfate
SIR	Resistência Sistêmica Induzida

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	16
2	OBJETIVOS.....	18
	2.1 <i>Objetivo Geral</i> .....	18
	2.2 <i>Objetivos específicos</i> .....	18
3	REFERENCIAL TEÓRICO .....	19
	3.1 Resistência de plantas a patógenos .....	19
	3.2 Proteínas PR: Proteínas relacionadas à patogênese .....	20
	3.3 Extração de DNA de plantas do Semiárido Paraibano .....	22
	3.4 Importância da bioinformática para a caracterização <i>in silico</i> de genes de plantas.....	24
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	27
	4.1 Seleção, coleta e caracterização de plantas do Horto Florestal do CES com características de interesse para estudos genômicos.....	27
	.....	28
	4.2 Extração de DNAs genômicos das plantas selecionadas .....	29
	4.2.1 Extração utilizando protocolo CTAB.....	30
	4.2.2 Extração utilizando protocolo SDS .....	31
	4.3 Eletroforese horizontal em gel de Agarose.....	31
	4.4 Quantificação de DNA em espectrofotômetro.....	32
	4.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	33
	4.6 Bioinformática .....	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
	5.1 Extração de DNA.....	35
	5.2 Diagnose da quantidade e qualidade dos DNAs genômicos isolados.....	35
	5.2.1 Análise da integridade dos DNAs genômicos por meio de eletroforese horizontal em gel de agarose .....	35
	5.2.2 Análise da quantidade e pureza dos DNAs por Espectrofotometria .....	38
	5.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	40
	5.3 Busca e caracterização <i>in silico</i> de genes PR-5 de famílias de plantas do semiárido Paraibano .....	41
6.	CONCLUSÕES .....	46
7.	REFERÊNCIAS .....	47



## 1 INTRODUÇÃO

O bioma Caatinga estende-se por todos os estados da região Nordeste do Brasil, que inclui a Bahia, Ceará, Piauí, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Alagoas, Maranhão e o norte de Minas, localizado no sudeste do país. A caatinga é caracterizada pelo clima semiárido, altas temperaturas, baixa umidade relativa do ar e constituída por uma vegetação exclusivamente brasileira, apresentando uma rica biodiversidade e fonte de recursos genéticos. Estima-se que pelo menos 932 espécies já tenham sido registradas para esta região, sendo 380 endêmicas (ROCHA et al., 2007). A Caatinga abriga 1/3 de espécies endêmicas, sua vegetação é formada por arbustos, árvores baixas, árvores que apresentam espinhos em seu caule e cactos, todas adaptadas ao clima quente e seco. O bioma abrange cerca de 800 mil Km<sup>2</sup> (IBGE, 2011), correspondendo a 11% do território nacional e 70% do nordestino (GONÇALVES, 2011), sendo considerado um dos biomas mais degradados pelo homem. A expressão Caatinga é um termo abrangente para caracterização das diversas fisionomias da região semiárida do Nordeste brasileiro, porém ainda é pouco conhecido apesar de ser mais diversa em espécies e endemismos que qualquer lugar do mundo que esteja exposto às mesmas condições de clima e de solo. Esse ecossistema apresenta uma flora única e ainda inexplorada, uma fonte riquíssima de material para estudos moleculares.

Dado a riqueza da diversidade dos recursos genéticos vegetais presentes no Horto Florestal do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande em Cuité PB, eles representam uma fonte valorosa para estudos e isolamentos de novos genes *PR-5*, que codificam novas possíveis proteínas antifúngicas, as quais poderiam ser empregadas em estratégias biotecnológicas voltadas para o setor agrícola, visando controlar doenças fúngicas, reduzindo assim as perdas econômicas. Embora os genes, independentemente de sua origem humana, vegetal, bacteriana, por exemplo, não sejam passíveis de proteção por meio de patentes, uma vez que não são propriedade tecnologicamente manufaturada, o "conhecimento" e os "processos de manipulação" sobre os genes, são. Portanto, sendo o conhecimento científico protegido como propriedade intelectual, a descoberta de genes vegetais responsáveis por determinada substância farmacêutica ou de importância agrícola terão seus valores determinados em termos de "royaltes" e de produtos com alto valor agregado.

A estratégia de prospecção de genes usando PCR com primers específicos representa um método rápido e eficiente na obtenção e caracterização de novos genes. As proteínas PR (relacionadas com a patogênese) do grupo 5, ou PR-5, são proteínas de defesa de plantas, comumente conhecidas como taumatinas ou osmotinas e possuem atividade antimicrobiana contra fungos e oomicetos, que também são organismos do tipo fungo. Estas proteínas podem agir pela permeabilização das membranas de fungos ou interação com receptores de membranas dos mesmos (NEWTON & DUMAN, 2000; ABAD BRAY et al., 2000; IBEAS et al., 2000), algumas podem se ligar a  $\beta$ -1,3-glucana e tem atividade detectável *in vitro* de  $\beta$ -1,3-glucanase (GRENIER et al., 1999; MENU-BOUAOUICHE et al., 2003). E, ainda, uma osmotina de fumo induz apoptose em *Saccharomyces cerevisiae* (NARASIMHAN et al., 2001; ALMEIDA et al., 2008).

Além da bem conhecida atividade antimicrobiana, um elo de proteínas PR-5 com a tolerância a seca já foi demonstrado (JUNG et al., 2005; SHARMA & KUMAR, 2005), o que incrementa a importância de estudos de prospecção de genes PR-5 em plantas do semiárido, pois os genes evoluem em resposta a adaptação às condições ambientais. Buscar novos genes PR-5 em plantas do semiárido é justificado ainda porque que genes que codificam proteínas antimicrobianas ocorrem naturalmente em plantas, especialmente as proteínas do tipo PR-5, já que estas participam do sistema imune inato de plantas e de animais, e protegem os hospedeiros da invasão por microrganismos patogênicos, incluindo fungos, bactéria e vírus, prevenindo doenças (CAMPOS et al., 2007; VAN LOON et al., 2006).

Entretanto, o estudo de prospecção de genes PR-5 em plantas do semiárido se esbarra em algumas limitações como, por exemplo, a escassez de informações sobre os genomas dessas plantas disponíveis em bancos de dados genômicos, o que dificulta o desenho de primers para isolamento usando a estratégia de PCR com primers específicos; além da necessidade de testar e otimizar protocolos para a extração do DNA total.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 *Objetivo Geral*

Realizar a caracterização molecular *in silico* de genes do tipo *PR-5* e a extração de DNA de plantas do semiárido paraibano, visando à amplificação por PCR.

### 2.2 *Objetivos específicos*

1. Selecionar, coletar e caracterizar pelo menos 10 plantas do semiárido com características de interesse para estudos genômicos;
2. Extrair, e analisar a quantidade e qualidade dos DNAs genômicos das plantas selecionadas, usando protocolos de extração, leitura em espectrofotômetro e eletroforese em gel de agarose;
3. Realizar reações em cadeia da polimerase (PCR) com combinações de primers específicos, visando prospectar genes que codificam isoformas de proteínas *PR-5* no genoma de plantas do semiárido paraibano;
4. Realizar busca e análise *in silico* de sequências de genes *PR-5*, visando gerar informações para o desenho de primers específicos para amplificação de genes completos.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Resistência de plantas a patógenos

Estudos sobre a resistência das plantas a estresses bióticos e abióticos vêm ganhando ênfase, não só na genética, mas em diversas áreas como a biotecnologia e agronomia, em virtude da crescente necessidade de estabelecer estratégias eficientes para o aumento das produções agrícolas ou para o controle de pragas e doenças, principais causas de perdas econômicas no setor. Os processos celulares associados às respostas da planta ocorrem por meio de mecanismos de defesa diferenciados em pré e pós-formados em relação à invasão do patógeno nos tecidos vegetais do hospedeiro, ambos são classificados em estruturais e bioquímicos. Os mecanismos de defesa pré-formados existem independentemente da interação do patógeno com o hospedeiro (AGRIOS, 2005). Os mecanismos estruturais como cutícula, tricoma, estômato e fibras, atuam como barreiras físicas tentando impedir ou retardar a penetração do patógeno, enquanto que os mecanismos bioquímicos produzem substâncias tóxicas ao patógeno invasor, como fenóis e alcaloides, inibindo o crescimento do mesmo e estabelecendo condições contrárias ao seu desenvolvimento no interior do hospedeiro (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008; PASCHOLATI et al., 2008; ROJAS, 2014).

Em contrapartida, os mecanismos de defesa pós-formados são ativados a partir da interação do patógeno com a planta hospedeira, ação que irá desencadear diversas respostas celulares, as quais vão desde o reconhecimento do patógeno até a transdução de sinais e expressão de vários genes de defesa (GARCION et al., 2007). Estes mecanismos também são classificados como estruturais (lignificação, camadas de cortiça, camadas de abscisão e papilas) e bioquímicos (fitoalexinas e proteínas PR).

Os mecanismos de defesa existentes nas plantas apresentam variedade e extrema eficiência. A resistência natural das plantas contra patógenos baseia-se em barreiras e mecanismos de defesa já existentes, independente da ação do patógeno no sítio da infecção. Segundo Bonaldo e Pascholati (2005) e Carvalho (2012), as plantas possuem mecanismos de resistência ainda mais eficientes, os quais permanecem inativos ou latentes, ativados apenas mediante exposição a agentes indutores, sendo assim chamada de resistência induzida, quando tais mecanismos são ativados, atuam de maneira eficaz no momento e local da infecção, permitindo que as plantas sobrevivam contra o ataque de patógenos. A expressão de alguns

genes confere à planta uma maior tolerância a estresses abióticos, como baixas temperaturas, altas temperaturas, estresse hídrico decorrente da falta de água e fechamento de estômatos.

### 3.2 Proteínas PR: Proteínas relacionadas à patogênese

A resistência das plantas aos estresses bióticos e abióticos deve-se a modificações intracelulares como a síntese de proteínas de defesa, as quais são expressas por genes específicos. Genes PR (de *Pathogenesis-Related*) codificam proteínas classificadas em 17 famílias, de PR-1 a PR-17 (Tabela 1) (VAN LOON et al., 2006; SINHA et al., 2014), e em sua grande maioria, tem expressão em nível basal sob condições normais de desenvolvimento da planta, no entanto, após estresse abiótico ou infecção causada por um agente patogênico, há um aumento significativo no nível de sua expressão (NOGUEIRA et al., 2012).

Tabela 1: Famílias de proteínas PR e suas propriedades químicas.

<b>FAMILIA</b>	<b>TIPO DO MEMBRO</b>	<b>PROPRIEDADES</b>
PR-1	Tabaco PR-1 <sup>a</sup>	Desconhecida
PR-2	Tabaco PR-2	B-1,3-glucanase
PR-3	Tabaco P, Q	Quitinase tipo I, II, IV, V VI, VII
PR-4	Tabaco “R”	Quitinase tipo I, II
PR-5	Tabaco S	Thaumatina-similar
PR-6	Tabaco Inibidor I	Protease-Inibidor
PR-7	Tabaco P69	Endoproteinase
PR-8	Cucumber chitinase	Quitinase tipo III
PR-9	Tabaco “lignina-forming”	Peroxidase
PR-10	Parsley “PR1”	Ribonuclease
PR-11	Tabaco “class V” chitinase	Quitinase tipo I
PR-12	Radish Rs-AFP3	Defensina
PR-13	Arabidopsis THI2.1	Tionina
PR-14	Barley LTP4	Proteínas de transferência de lipídeos
PR-15	Barley OxOa (germin)	Oxalato oxidase
PR-16	Barley OxOLP	Oxalato oxidase-similar
PR-17	Tabaco PRp27	Desconhecida

Fonte: Van Loon et al., (2006).

Proteínas PR podem estar localizadas em diversas regiões das plantas, incluindo caules, flores e raízes, porém encontram-se em maior abundância nas folhas. Na defesa de plantas contra patógenos, as proteínas PR podem atuar diretamente, impedindo o desenvolvimento e instalação do patógeno, ou indiretamente, induzindo a resistência, uma forma de prevenir a invasão nos tecidos vegetais. De modo geral, proteínas PR apresentam algumas especificidades quanto às suas atividades, por exemplo, as PR-3, PR-4, PR-8 e PR-11 são classificadas como quitinases e a PR-2 como glucanases, atuando diretamente na hidrólise de quitina e glucana, respectivamente, polímeros presentes na parede celular de fungos, enquanto que outras proteínas como é o caso das PR-5, PR-12, PR-13 e PR-14 atuam na membrana plasmática, já as PR-7 são endoproteínases e as PR-10 ribonucleases (STANGARLIN, 2011).

As proteínas PR do grupo 5, ou PR-5, comumente conhecidas como permatinas, taumatinas ou osmotinas, são de particular importância. A família PR-5 é constituída de proteínas ácidas e básicas, de acordo com seus pontos isoelétricos, porém desempenham atividades semelhantes. A atividade antifúngica das proteínas PR-5 é desencadeada por infecção causada por patógenos, os quais promovem um rápido aumento de sua expressão. Tais proteínas são responsáveis por atuarem na permeabilização da membrana plasmática do patógeno invasor, causando uma perturbação na bicamada lipídica, criando poros transmembrana (EL-KEREAMY et al., 2011). Também foi proposto que elas podem agir pela interação com receptores de membranas de fungos (NEWTON & DUMAN, 2000; ABAD et al., 1996; ANZLOVAR et al., 1998; YUN et al., 1997; BRAY et al., 2000; IBEAS et al., 2000). Além disso, já foi demonstrado que um número de proteínas PR-5 se ligam a  $\beta$ -1,3-glucana e tem atividade detectável *in vitro* de  $\beta$ -1,3-glucanase (GRENIER et al., 1999; MENU-BOUAOUICHE et al., 2003). E, ainda, uma osmotina de fumo induz apoptose em *Saccharomyces cerevisiae* (NARASIMHAN et al., 2001; ALMEIDA et al., 2008).

Recentes estudos com plantas transgênicas demonstraram que essa proteína atua de modo eficaz na inibição de hifas e crescimento de esporos de fungos no local da infecção (EL-KEREAMY et al., 2011). A indução dessa proteína por infecção fúngica pode estar relacionada com a ativação de outras linhas de defesa da planta, como o acúmulo de moléculas antimicrobianas, tais como escopoletina, uma fitoalexina (MOHAMED et al., 2010), sugerindo desse modo, que as proteínas PR-5 desempenhariam funções adicionais nas células vegetais, contribuindo indiretamente para a ativação de outros mecanismos de defesa (EL-KEREAMY et al., 2011).

Comumente detecta-se altos níveis de expressão de *PR-5* em folhas jovens sob estresse (SINHA et al., 2014). A super expressão de *PR-5* em algumas espécies de plantas transgênicas tem resultado em um aumento significativo da resistência a estresses bióticos como doenças fúngicas e abióticos, como o estresse hídrico e alterações de temperatura (SAROWAR et al., 2005; TAKAHASHI et al., 2005; EL-KEREAMY et al., 2011). Assim, além da bem conhecida atividade antimicrobiana, um elo de proteínas *PR-5* com a resistência a seca já foi demonstrado (JUNG et al., 2005; SHARMA & KUMAR, 2005), o que incrementa a importância de estudos de prospecção de genes *PR-5* em plantas do semiárido, pois os genes evoluem em resposta a adaptação às condições ambientais. Buscar novos genes *PR-5* em plantas do semiárido é justificado ainda porque genes que codificam proteínas antimicrobianas ocorrem naturalmente em plantas, especialmente as proteínas do tipo *PR-5*, como as osmotinas, já que estas participam do sistema imune inato de plantas e de animais, e protegem os hospedeiros da invasão por microrganismos patogênicos, incluindo fungos, bactéria e vírus, prevenindo doenças (CAMPOS et al., 2007; VAN LOON et al., 2006).

### **3.3 Extração de DNA de plantas do Semiárido Paraibano**

O Brasil é um país que possui grande diversidade biológica, abrigando riquezas de fauna e flora, as quais estão distribuídas em seis grandes biomas: Caatinga, Cerrado, Campos e Florestas Meridionais, Floresta Atlântica, Floresta Amazônica e Pantanal. A Caatinga é um ecossistema muito importante, se concentra no Nordeste brasileiro que inclui os estados da Bahia, Ceará, Piauí, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Alagoas, Maranhão, e o norte de Minas, localizado no sudeste do país. É caracterizado por um clima semiárido, baixa umidade relativa do ar e altas temperaturas, e apesar da aridez, a região é rica em biodiversidade, apresentando uma flora única, formada por vegetação constituída de espécies lenhosas, herbáceas, cactáceas e bromeliáceas, todas adaptadas ao clima quente e seco. É um ecossistema exclusivamente brasileiro e estima-se que pelo menos 932 espécies já foram registradas para a região, sendo 380 endêmicas (ROCHA et al., 2007). Esse bioma apresenta grande riqueza faunística, uma fonte inexplorada de recursos genéticos, por esse motivo estudos moleculares voltados para espécies nativas são de suma importância para o desenvolvimento técnico-científico da região, em virtude do crescente número de programas de melhoramento genético no país (SILVA & MEDEIROS FILHO, 2006; VERA et al., 2007).

Com o crescente avanço da ciência o homem foi capaz de codificar o DNA, a molécula informacional da vida. A partir desse importante salto na história da ciência, foi possível desenvolver várias técnicas moleculares, capazes de modificar organismos, os chamados organismos geneticamente modificados (OGMs) ou até mesmo criar novos organismos. O desenvolvimento da genética proporcionou progressos para áreas como a agricultura e a medicina (LOPES, 2012). O DNA, ácido desoxirribonucleico, é uma macro molécula composta por polímeros de subunidades monoméricas, denominados nucleotídeos, compostos por uma pentose (molécula de açúcar com cinco carbonos), um grupamento fosfato e quatro bases nitrogenadas (A, T, G e C), que se encontram dispostas em diferentes sequências. Os nucleotídeos são componentes fundamentais para a síntese dos ácidos nucleicos. Diferentes sequências de nucleotídeos formam unidades de informação, conhecidas como genes. O gene é definido na Biologia Molecular como um segmento de DNA que codifica a informação para produtos funcionais como RNA e proteína (OLIVEIRA et al., 2007).

Para a genética, o DNA é considerado a matéria prima para a construção de qualquer conhecimento ou desenvolvimento de tecnologias aplicadas nesta área (SOLLÉRO, 2004). O DNA genômico de plantas pode ser obtido a partir do caule, da folha, raiz, fruto, flor e sementes. No entanto, a extração de DNA de folhas jovens é a mais comumente utilizada, por conter grandes quantidades de DNA e por ser um material de fácil maceração. Tradicionalmente, a extração de DNA consiste em três etapas principais: lise das células, purificação e precipitação. As metodologias atuais, utilização de kits, empregam os mesmos princípios básicos, porém podem apresentar algumas diferenças, principalmente, na etapa de purificação e precipitação do DNA (CALDART, 2011).

Em laboratórios de biologia molecular, a busca por métodos de extração eficientes que forneça DNA livre de inibidores, íntegro e em quantidade suficiente é uma constante para garantir um bom desempenho das técnicas moleculares, obtendo bons resultados (SANTOS, 2009). Para a obtenção do DNA são utilizados diversos métodos, no entanto, em virtude da variedade da composição dos tecidos vegetais das espécies de interesse e das condições laboratoriais, são necessárias algumas modificações e adaptações nos protocolos utilizados, visando melhorar os resultados em termos qualitativos e quantitativos. Tais adaptações são necessárias em virtude de algumas espécies vegetais apresentarem altos níveis de polifenóis, carboidratos e um tecido foliar resistente que dificulta o processo de maceração, sendo importante uma otimização que facilite a obtenção do material genético (CANSANÇÃO & COUTINHO, 2013). A extração de DNA é descrita como um pré-requisito indispensável para



várias análises moleculares, portanto estudos sobre os diferentes métodos de extração de DNA são fundamentais para o desenvolvimento de pesquisas na área da biologia molecular (SOLLÉRO, 2004).

### **3.4 Importância da bioinformática para a caracterização *in silico* de genes de plantas**

A bioinformática ou biologia computacional é uma área da ciência da computação voltada para a compreensão das funções biológicas, proporcionando a realização de diversas análises do conteúdo informacional dos genomas, além disso, tem ajudado no desenvolvimento de diversas ferramentas computacionais, capazes de analisar a complexidade de sequências geradas e armazenar esse grande volume de informação em banco de dados, os quais servirão de base para estudos biológicos e médicos (BORÉM & MIRANDA, 2005). Para Arbex (2006), o fator determinante para o desenvolvimento da bioinformática foi o projeto Genoma, tendo em vista a necessidade de um sistema computacional com alta capacidade de armazenamento, em virtude da gama de informações geradas nesse projeto. Desse modo, torna-se indispensável a utilização de ferramentas computacionais para a interpretação e análises dos resultados (ZATZ, 2002). A interdisciplinaridade da bioinformática promove a interação de conhecimentos de diversas áreas, como a biologia molecular, química, física, matemática, informática, e a estatística, tendo como objetivo desenvolver e aplicar técnicas computacionais (BARBOSA, 2010).

Para Martins (2007), o intercâmbio de conhecimentos entre a biologia e a informática tem passado por impulsos renovadores. A partir da biologia foram desenvolvidos diversos modelos computacionais, como as redes neurais artificiais, algoritmos genéticos e sistemas computacionais baseados no sistema imunológico. À frente do progresso da bioinformática está o sequenciamento do DNA, que permite a realização de estudos tanto do genoma estrutural, quanto do genoma funcional de vários organismos. Para as análises *in silico*, selecionam-se os dados gerados por meio do sequenciamento, tendo como objetivo localizar sequências de genes de interesse, porém para a realização de um estudo completo necessita-se de uma confirmação, feita por meio de metodologias de genômica funcional (OLIVEIRA, 2012).

A bioinformática encontra-se dividida em modalidades focadas em conjuntos de dados específicos, as chamadas ômicas. A mais tradicional, a genômica, se dirige ao conjunto total de genes de um sistema biológico. Já a proteômica é voltada para o estudo da coleção completa de proteínas que são expressas em um sistema. Outras mais recentes têm foco no conjunto de RNA

transcritos (transcriptoma), nas vias metabólicas (metaboloma), e nas interações entre proteínas (interactoma) (MARTINS, 2007).

A bioinformática progrediu muito nos últimos anos, possibilitando o surgimento de subdisciplinas, tais como a biologia computacional, responsável pelo procedimento de análises e interpretações de vários tipos de dados, que inclui as sequências de nucleotídeos, aminoácidos e também estruturas proteicas. O elevado número de informações que necessitam serem precisamente interpretadas, organizadas e posteriormente decifradas, podem localizar informações valiosíssimas a respeito dos mecanismos biológicos (SILVA, 2006). Pesquisadores têm desenvolvido métodos estatísticos com grande capacidade de análise, compreensão das funções gênicas e níveis de expressão. Com o auxílio da internet é possível promover compartilhamentos de dados biológicos, o que torna a bioinformática importante e bem difundida no campo científico (ARAÚJO, 2008).

Além do armazenamento e análise de sequências, a bioinformática apresenta programas capazes de promover o reconhecimento de genes específicos, alinhamento de sequências de interesse, análise de expressão gênica e de interação gene-a-gene, reconstrução de árvores filogenéticas e montagem de estruturas proteicas, porém a identificação é feita apenas de sequências gênicas e proteicas já conhecidas e depositadas nos banco de dados, indicando que uma vez que genes ou proteínas com funções desconhecidas são ignoradas, pode se tratar de uma nova descoberta. Desse modo, ferramentas computacionais têm sido amplamente utilizadas para identificar genes candidatos para validação funcional em expressão *in planta* (KAMOUN, 2006). Segundo Arbex (2006), para utilizar-se avançados sistemas computacionais, se faz necessário a capacitação dos profissionais para a manipulação adequada dos mesmos. Diante disso, surge o bioinformata, profissional responsável por utilizar os recursos computacionais para solucionar problemas biológicos.

Atualmente, tem se dado ênfase a interpretação dos dados gerados, em função do crescente aumento de estudos de caracterização molecular *in silico*, que necessitam da caracterização por análises experimentais e emprego de ferramentas computacionais cada vez mais sofisticadas. Dessa forma, a bioinformática tem contribuído tanto para as pesquisas básicas, quanto para a ciência aplicada, promovendo o esclarecimento de muitos processos celulares, garantindo assim sua aplicação e disseminação em diversas áreas do conhecimento científico (ARAÚJO, 2008).

O benefício do armazenamento de informações em banco de dados é a disponibilização dessas informações para pesquisadores do mundo todo. O GenBank é um dos mais completos

e conhecidos banco de dados público, o principal banco de dados do NCBI, constituído por subdivisões contendo todas as sequências de DNA, RNA e de proteínas disponíveis atualmente, ele surgiu para promover e incentivar o acesso a essas informações, o NCBI não restringe de nenhum modo o uso ou compartilhamento dos dados do GenBank (NCBI).

Dentre as ferramentas mais conhecidas para análise de sequências biológicas, encontra-se o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Esta ferramenta faz comparações de uma sequência de nucleotídeos ou de proteína com todas as sequências genômicas depositadas no GenBank, as quais já tiveram suas funções biológicas determinadas experimentalmente, na tentativa de identificar possíveis similaridades com a sequência de interesse, atribuindo a ela uma função. No BLAST existem ainda algumas divisões, diferentes programas que buscam homologia entre: sequência de aminoácidos (blastp), sequência de nucleotídeos (blastn), sequência de nucleotídeo traduzida em todas as seis fases de leitura contra um banco de dados de sequência de proteína (blastx), sequência de proteínas contra um banco de dados de sequências de nucleotídeos dinamicamente traduzidas em todas as fases de leitura (tblastn), traduções das seis fases de leitura de uma sequência de nucleotídeos contra as traduções das seis fases de leitura de um banco de dados de sequência de nucleotídeo (tblastx) (SILVA, 2006).

Para a caracterização molecular *in silico* de genes são utilizadas outras ferramentas computacionais disponíveis online, como os programas ORFFinder, que identifica a presença de genes completos e ClustalW que promove o alinhamento de sequências de DNA ou proteína. As informações geradas a partir dos programas se deparam com a necessidade de interpretação biológica funcional, podendo ser utilizadas em novas etapas como biologia estrutural para desenho de novas moléculas funcionais mutadas ou não e para o desenho de primers iniciadores para o isolamento ou caracterização molecular de espécies.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Seleção, coleta e caracterização de plantas do Horto Florestal do CES com características de interesse para estudos genômicos

Primeiramente foi realizada uma pesquisa das plantas presentes na Caatinga e logo em seguida uma trilha no Horto Florestal Olho d'água da Bica CES/UFCG (FIGURA 1) para a identificação das espécies por meio de fotografias. Foram selecionadas 16 plantas nativas ou introduzidas no semiárido paraibano, as quais possuem características de resistência a estresses bióticos e tolerância a estresses abióticos. As plantas selecionadas no Horto Florestal e no CES foram fotografadas (FIGURA 2) e identificadas pelo nome popular e científico (TABELA 2). A coleta de folhas das espécies foi realizada sempre um dia antes da extração, para congelar o tecido vegetal, visando agilizar o processo de maceração para obter melhor resultado. Para cada planta, folhas jovens foram coletadas, embrulhadas em papel alumínio, identificadas com o nome popular da espécie e transportadas em uma cuba de isopor com gelo até o Laboratório de Biotecnologia (LBiotec) do CES. No LBiotec, as folhas foram lavadas uma vez com água e detergente e duas vezes com água destilada, em seguida, embrulhadas novamente no papel alumínio e armazenadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração.



Figura 1: Vista aérea parcial do Horto Florestal Olho D'água da Bica, CES/UFCG.

Fonte: Google Imagens.



Figura 2: Ilustração de espécies cujo DNA foi extraído. (A) Algaroba (*Prosopis juliflora*); (B) Azeitona Roxa (*Syzygium cumini*); (C) Baraúna (*Schinopsis brasiliensis*); (D) Umbu (*Phytolacca dioica* L); (E) Canafístula (*Senna spectabilis*); (F) Caju (*Anacardium occidentale* L); (G) Catingueira (*Caesalpinia pyramidalis*); (H) Feijão Bravo (*Capparis flexuosa* L); (I) Juazeiro (*Ziziphus joazeiro*); (J) Jurubeba (*Solanum paniculatum*); (L) Jurema Preta (*Mimosa tinuiflora*); (M) Laranja (*Citrus aurantium*); (N) Mulungu (*Erythrina mulungu*); (O) Pinha (*Annona Squamosa*); (P) Limãozinho (*Zanthoxylum stelligerum*); (Q) Romã (*Punica granatum*).

Tabela 2: Espécies selecionadas para extração de DNA pelos protocolos CTAB e SDS.

<b>ESPÉCIE</b>	<b>NOME POPULAR</b>
<i>Prosopis juliflora</i>	Algaroba
<i>Syzygium cumini</i>	Azeitona Roxa
<i>Phytolacca dioica L</i>	Umbu
<i>Schinopsis brasiliensis</i>	Baraúna
<i>Anacardium occidentale L</i>	Caju
<i>Senna spectabilis</i>	Canafistula
<i>Caesalpinia pyramidalis</i>	Catingueira
<i>Capparis flexuosa L</i>	Feijão-Bravo
<i>Solanum paniculatum L</i>	Jurubeba
<i>Ziziphus joazeiro</i>	Juazeiro
<i>Mimosa tinuiflora</i>	Jurema preta
<i>Citrus aurantium</i>	Laranja azeda
<i>Zanthoxylum stelligerum</i>	Limãozinho
<i>Erythrina mulungu</i>	Mulungu
<i>Annona Squamosa</i>	Pinha
<i>Punica granatum</i>	Romã

Fonte: Dados da Pesquisa

#### 4.2 Extração de DNAs genômicos das plantas selecionadas

Dois métodos de extração foram testados para analisar qual produziria melhor qualidade e quantidade de DNA de acordo com as espécies em estudo. Utilizando ambos os protocolos, DNAs genômicos foram extraídos a partir das 16 plantas coletadas no Horto Florestal Olho D'água da Bica e no CES/UFCG, utilizando um protocolo de extração com fenol descrito no Laboratório de Biotecnologia da UFCG - Campus Cuité. Imagens da extração estão ilustradas na Figura 3.

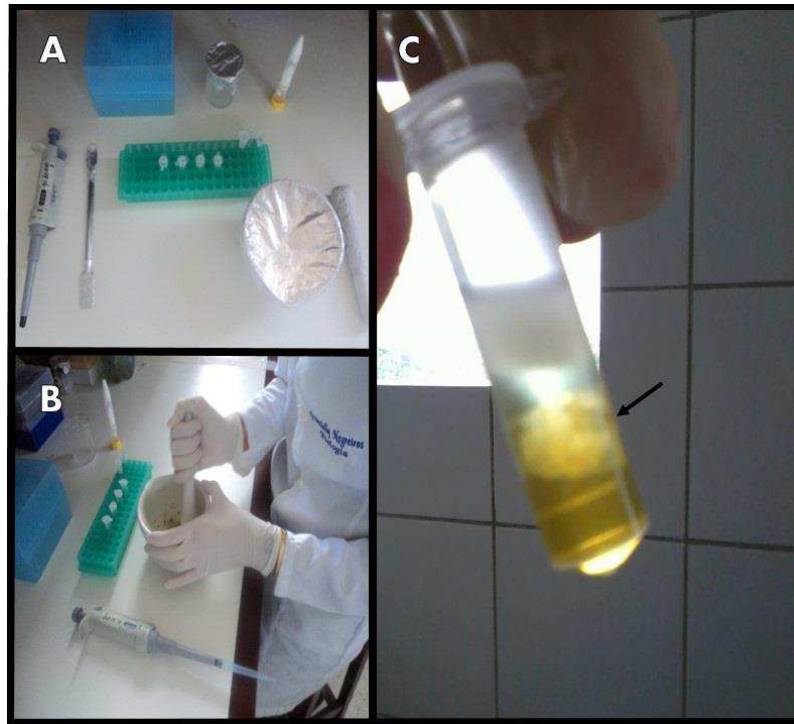


Figura 3: Ilustrações de materiais utilizados e etapas da extração de DNA de plantas. (A) Material utilizado para a extração de DNA genômico; (B) Processo de lise química e mecânica das células do tecido foliar; (C) Visualização do novelo de DNA da espécie *Mimosa tinuiflora*.

#### 4.2.1 Extração utilizando protocolo CTAB

Em torno de 1 grama de tecido vegetal jovem foi macerado utilizando cadinho e pistilo autoclavados e congelados, até a obtenção de um pó, ao qual foi adicionado o tampão de extração CTAB (CTAB 2%, NaCl 2 M, Tris-HCl pH 8,0 200 Mm, EDTA pH 8,0 20 mM). Aproximadamente 800  $\mu$ L da amostra foram recuperados em microtubulos de 2 mL. Na capela de exaustão adicionou-se à amostra, 2  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol, 10  $\mu$ L de RNase A e 1  $\mu$ L de Proteinase K. A amostra foi levada ao banho Maria por 30 minutos à 65°C, vertendo os tubos gentilmente de vez em quando. Igual volume (800  $\mu$ L) de clorofil (Clorofórmio: álcool isoamílico, 24:1) foram adicionados às amostras, misturado no vórtex e centrifugado a 12000 rpm, durante 10 minutos à 20°C. O sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo tubo, onde se adicionou igual volume (800  $\mu$ L) de isopropanol gelado à -20°C. As amostras foram armazenadas por 2 horas à -20°C, em seguida centrifugadas a 12000 rpm, durante 10 minutos à 20°C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 500  $\mu$ L de Etanol 70% gelado, centrifugados a 12000 rpm, durante 5 minutos à 20°C. Após descartar o

sobrenadante, o pellet foi seco à temperatura ambiente na capela de exaustão e o DNA foi resuspendido em 50  $\mu$ L de água milli-Q.

#### **4.2.2 Extração utilizando protocolo SDS**

Aproximadamente 1 grama de tecido vegetal jovem foi macerado utilizando cadinho e pistilo autoclavados e congelados, até a obtenção de um pó, ao qual foi adicionado aproximadamente 0,3 g de PVP e a solução tampão SDS (SDS 1%, NaCl 2 M, Tris-HCl pH 8,0 200 mM, EDTA pH 8,0 20 mM). Recuperou-se aproximadamente 800  $\mu$ L da amostra, adicionando em microtubulos de 2 mL. Na capela de exaustão adicionou-se à amostra, 2  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol, 10  $\mu$ L de RNase A e 1  $\mu$ L de Proteinase K. As amostras foram incubadas em banho-Maria por 30 minutos à 65°C, vertendo os tubos gentilmente de vez em quando. Após as amostras esfriarem em temperatura ambiente foi adicionado 800  $\mu$ L de Fenol saturado, misturado no vortex e centrifugado a 12000 rpm durante 5 minutos à 20°C. O sobrenadante foi recuperado e transferido para novos microtubulos, nos quais adicionou-se igual volume (800  $\mu$ L) de clorofane (Fenol: Clorofórmio: Álcool isoamílico, 25:24:1), misturado no vortex por 1 minuto e centrifugado a 12000 rpm durante 5 minutos à 20°C. O sobrenadante foi novamente recuperado e transferido para novos microtubulos, adicionado igual volume (800 $\mu$ L) de clorofil, misturado no vortex por 1 minuto e centrifugado a 12000 rpm durante 5 minutos à 20°C. Recuperado o sobrenadante, foi transferido para outros microtubulos, e adicionado 2,5 volume de etanol gelado, mais 0,3 molar de Acetato de sódio 3 M (NaAc), os tubos foram vertidos gentilmente e armazenados à -20°C por 2 horas. Em seguida foram centrifugados a 12000 rpm durante 10 minutos à 20°C, descartado o sobrenadante e o pellet foi lavado com 500  $\mu$ L de Etanol 70% gelado, centrifugado a 12000 rpm por 1-2 minuto à 20°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco à temperatura ambiente na capela de exaustão, resuspendendo o DNA em 50  $\mu$ L de água milli-Q.

#### **4.3 Eletroforese horizontal em gel de Agarose**

O gel de agarose foi preparado na concentração de 1%. Em um erlenmeyer foi adicionado 150 mL de T.A.E (Tris HCl 1 M, Ácido acético glacial e EDTA 500 mM)1X e 1,5 grama de agarose, em seguida foi levado ao micro-ondas por 4 minutos. Após o gel atingir a temperatura ideal (morno) adicionou-se 5  $\mu$ L de Brometo de etídeo (1%), misturando com cuidado no gel para não formar bolhas. O gel foi vertido na cama de eletroforese, aguardando



aproximadamente 30 minutos para a solidificação do gel e retirada do pente. Depois de encaixar a cama na cuba de eletroforese (FIGURA 4), foi adicionado T.A.E 1X.



Figura 4: Equipamento de eletroforese horizontal em funcionamento acoplado a uma fonte de eletroforese.

Foram aplicados 15  $\mu\text{L}$  do marcador LowRanger 100 bp DNA Ladder, no primeiro poço do gel e 5  $\mu\text{L}$  de DNA juntamente com 2  $\mu\text{L}$  de Tampão de amostra nos poços restantes. As condições de corrida para a migração do DNA em gel foi realizada a 100 Voltz por 30 minutos. O gel foi visualizado posteriormente sob luz ultravioleta em um transiluminador e fotodocumentado.

#### 4.4 Quantificação de DNA em espectrofotômetro

Em virtude da quantidade de DNA extraído variar de acordo com a espécie vegetal e o protocolo utilizado, foi realizada a quantificação do DNA das amostras por espectrofotometria, com concentração medida por leitura em densidade ótica, no comprimento de ondas ultravioleta. As amostras de DNA extraídas por meio de ambos os protocolos foram submetidas a análise de concentração e pureza, determinadas através da leitura de absorbância em 260 nm e em 280 nm (quantificação de proteínas) no espectrofotômetro (Nanodrop Thermo Scientific 2000), utilizando uma pequena alíquota do produto de extração, somente 1  $\mu\text{L}$  da amostra. De acordo com Barufi (2010), o Nanodrop quantifica o DNA de acordo com a lei de Lambert-Beer modificada:

$$C = \frac{\text{Abs} \times e}{b}$$

Onde o **C** é a concentração de DNA em ng/μL, **Abs** é a absorvância, 260 nm correspondente ao pico de absorção de UV do DNA, o **e** é o coeficiente de extinção molar, que para o DNA fita dupla equivale a 50 ng.cm/μL, e **b** é a altura da coluna do espectrofotômetro, que corresponde a 1 cm. O valor obtido pelo Nanodrop em absorvância de 260 nm, multiplicado por 50 (valor constante de **e**), indica a concentração de DNA na amostra em ng/μL.

#### 4.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Ensaio preliminares sobre as condições para a amplificação de novos genes do tipo *PR-5* foram realizados usando a técnica de PCR com os DNAs extraídos e os *primers* específicos descritos por Campos et al., (2002): PPS1 (5' CGC *GGA TCC* ATG GGC TAC TTG AGA TCT 3'); PCTP1 (5' CCC *AAG CTT* TTA CTT GGC CAC TTC ATC 3') e outros dois primers PPS2 e PCTP2 disponíveis no LBiotec. Visando à amplificação de um segmento conhecido do DNA para genes *PR-5*, as amostras foram submetidas a duas combinações de primers: PPS1/PCTP1 e PPS2/PCTP2. Para ambas as combinações de primers, foi preparado um master mix para 40 reações de 25 μL, utilizando 100 μL de Tampão PCR Buffer minus Mg (Invitrogen); 30 μL de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen); 8 μL de dNTP's; 25 μL de Primer Senso; 25 μL de Primer Antisenso; 12 μL da enzima Taq DNA Polimerase Recombinante (Invitrogen); 600 μL de H<sub>2</sub>O destilada e 5 μL de DNA. Cada ciclo da PCR apresenta três fases fundamentais que necessitam de diferentes temperaturas: desnaturação, anelamento e extensão, para as quais foram definidas a seguintes condições térmicas: 1 ciclo a 95°C/2 min, seguidos por 35 ciclos 95°C/45 seg, 49°C/30 seg e 72°C/1 min, e uma extensão final a 72°C/5 min em termociclador (Applied Biosystems). Foram realizadas várias PCRs, utilizando no total 14 combinações de primers (TABELA 3).

Tabela 3: Combinações de primers utilizados nas reações de PCR.

<b>COMBINAÇÕES DE PRIMERS</b>	
PPS1/PCTP1	NP1/P5
PPS2/PCTP2	NP1/P4
PPS2/PCTP1	NP1/JP3R
PPS3/PCTP1	NP1/P2R
PPS3/PCTP2	NP1/P1R
PPS1/PPM2	AP24/AP24R
PPM1/PPM2	PPM1/P5

Fonte: Dados da Pesquisa

#### **4.6 Bioinformática**

Para disponibilizar informações de sequências para o desenho de novos primers, visando à amplificação de genes do tipo PR-5 em plantas do semiárido Paraibano, foi realizada uma pesquisa por proteínas PR-5 no banco de dados Genbank/NCBI - *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), a partir do sub banco de nucleotídeo e proteína, utilizando como palavras-chave os nomes científicos das espécies em estudo, os gêneros e famílias de plantas descritas na Caatinga cruzado com o nome da proteína de interesse: PR-5, Pathogenesis-Related, Thaumatin e Osmotin. Em seguida, analisadas quanto sua similaridade com outras proteínas depositadas no mesmo banco de dados e alinhadas com auxílio do programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). O programa ORFfinder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) foi utilizado para encontrar a ORF (*Open Reading Frame*).

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Extração de DNA**

DNAs genômicos foram extraídos de 16 espécies de plantas nativas ou introduzidas no semiárido paraibano, utilizando os protocolos CTAB e SDS. A extração de DNA é muito importante para as análises de organização e estrutura do genoma de plantas, para o isolamento de genes por PCR e caracterização molecular. Para um ótimo resultado de qualquer técnica molecular é imprescindível um DNA de qualidade, quantificação e conservação em temperatura adequada. No entanto, esta etapa apresenta dificuldades em relação a purificação do DNA, em função da presença de grande quantidade de polissacarídeos e fenóis em algumas espécies. A coleta do tecido foliar e armazenamento em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  por 24h antes da extração, agilizou o processo de maceração, mostrando-se uma eficiente estratégia para tentar maximizar o rendimento de DNA, uma vez que no LBIotec não dispomos de  $\text{N}_2$  líquido, o que dificulta o processo de maceração e preservação do material genético.

### **5.2 Diagnose da quantidade e qualidade dos DNAs genômicos isolados**

Para a análise do DNA genômico foi necessário primeiramente determinar a qualidade e concentração das amostras. Atualmente vários são os métodos eficientes para as análises qualitativas e quantitativas do DNA em uma amostra, dentre elas, as mais utilizadas é a eletroforese, visualizada por meio da fluorescência emitida por um transiluminador após exposição a UV dos ácidos nucleicos intercalados com brometo de etídio, e a espectrofotometria, realizando medições de absorbância a 260 nm e 280 nm com o uso de um espectrofotômetro Nanodrop.

#### **5.2.1 Análise da integridade dos DNAs genômicos por meio de eletroforese horizontal em gel de agarose**

O diagnóstico da qualidade dos DNAs genômicos, isolados das 16 plantas pelos protocolos CTAB e SDS, foi feito por eletroforese horizontal em gel de agarose 1% (FIGURA 5 e 6). A partir da eletroforese foi possível observar a baixa concentração e degradação do material genéticos nas amostras de ambos os protocolos de extração. Das dezesseis amostras de DNA extraídas pelo protocolo CTAB (FIGURA 5), nove não foram visualizadas no gel,

apresentando baixa concentração de DNA. Das sete amostras visualizadas no gel apenas a 4, 10 e 11 apresentaram uma fluorescência mais nítida, revelando uma concentração de DNA maior que as demais, correspondente as espécies: Jurema Preta (*Mimosa tinuiflora*), Limãozinho (*Zanthoxylum stelligerum*) e Algaroba (*Prosopis juliflora*), respectivamente.

Para o protocolo SDS, sete amostras apresentaram baixa concentração de DNA, não sendo possível visualizá-las no gel (FIGURA 6), já para as nove amostras visualizadas no gel, sete delas apresentaram degradação, uma apresentou uma banda com fluorescência mais nítida, revelando a presença de DNA, correspondente ao Caju (*Anacardium occidentale L*); e a outra amostra apresentou degradação e contaminação por RNA. O problema da degradação dos DNAs isolados pode ser pela ausência de nitrogênio líquido durante o processo de maceração dos tecidos foliares, bem como pelas várias etapas de manuseio do protocolo.

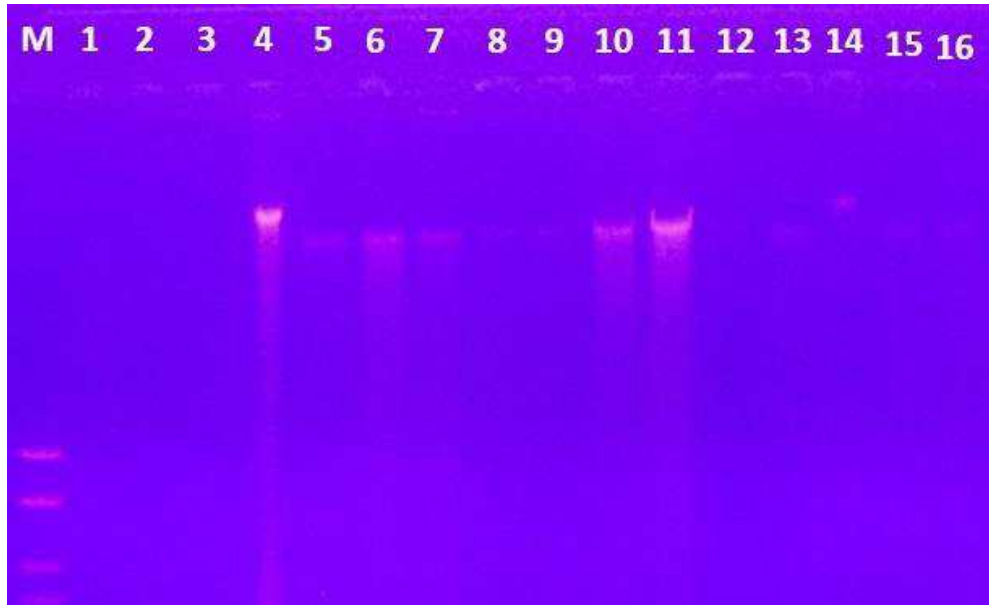


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 1% dos DNAs genômicos extraídos pelo protocolo CTAB. Sequência de poços no gel: **1-** Mulungu (*Erythrina mulungu*); **2-** Juazeiro (*Ziziphus joazeiro*); **3-** Romã (*Punica granatum*); **4-** Jurema Preta (*Mimosa tinuiflora*); **5-** Jurubeba (*Solanum paniculatum*); **6-** Catingueira (*Caesalpinia pyramidalis*); **7-** Baraúna (*Schinopsis brasiliensis*); **8-** Azeitona Roxa (*Syzygium cumini*); **9-** Caju (*Anacardium occidentale L*); **10-** Limãozinho (*Zanthoxylum stelligerum*); **11-** Algaroba (*Prosopis juliflora*); **12-** Umbu (*Phytolacca dioica L*); **13-** Canafístula (*Senna spectabilis*); **14-** Pinha (*Annona Squamosa*); **15-** Laranja (*Citrus aurantium*); **16-** Feijão Bravo (*Capparis flexuosa L*).

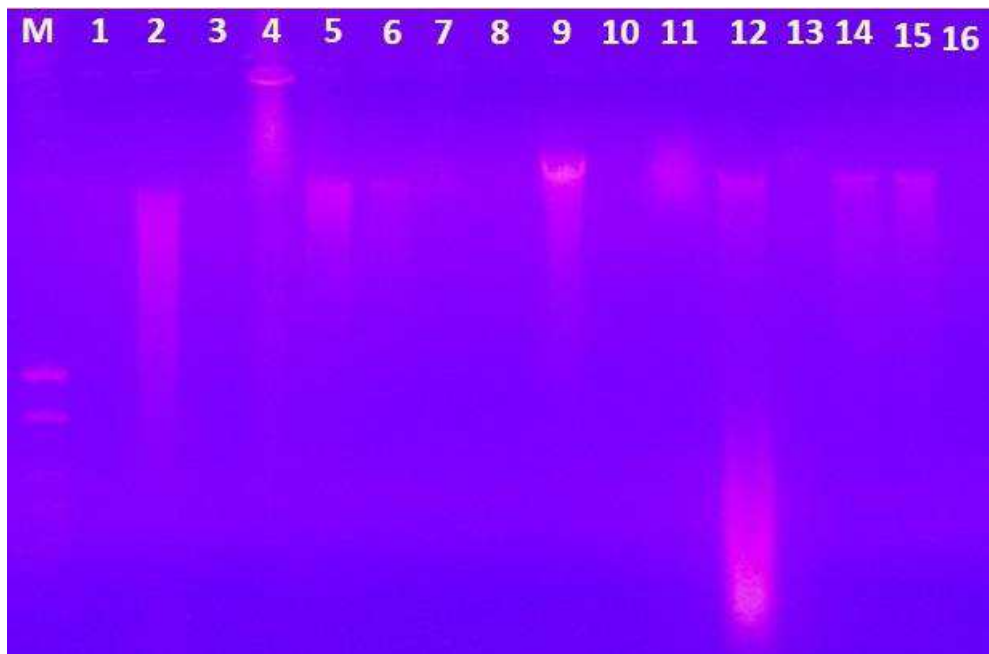


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 1% dos DNAs genômicos extraídos pelo protocolo SDS. Sequência de poços no gel: **1-** Mulungu (*Erythrina mulungu*); **2-** Juazeiro (*Ziziphus joazeiro*); **3-** Romã (*Punica granatum*); **4-** Jurema Preta (*Mimosa tinuiflora*); **5-** Jurubeba (*Solanum paniculatum*); **6-** Catingueira (*Caesalpinia pyramidalis*); **7-** Baraúna (*Schinopsis brasiliensis*); **8-** Azeitona Roxa (*Syzygium cumini*); **9-** Caju (*Anacardium occidentale L*); **10-** Limãozinho (*Zanthoxylum stelligerum*); **11-** Algaroba (*Prosopis juliflora*); **12-** Umbu (*Phytolacca dioica L*); **13-** Canafístula (*Senna spectabilis*); **14-** Pinha (*Annona Squamosa*); **15-** Laranja (*Citrus aurantium*); **16-** Feijão Bravo (*Capparis flexuosa L*).

### 5.2.2 Análise da quantidade e pureza dos DNAs por Espectrofotometria

Com base na análise da pureza e quantidade dos DNAs extraídos pelos protocolos CTAB e SDS, realizada em espectrofotômetro Nanodrop 2000, as amostras de ambos os protocolos apresentaram uma média de concentração de DNA superior a 100 ng/μL com índice 260/280 igual ou superior a 1,8 para a maioria das amostras, ou seja, um ótimo valor (TABELA 4).

Tabela 4: Quantificação e análise de pureza das amostras de DNA extraído de 16 espécies pelos protocolos CTAB (números ímpares) e SDS (números pares), utilizando leituras de absorbância de 260 e 280 nm. **1-2** Mulungu; **3-4** Juazeiro; **5-6** Romã; **7-8** Jurema Preta; **9-10** Jurubeba; **11-12** Catingueira; **13-14** Baraúna; **15-16** Azeitona Roxa; **17-18** Caju; **19-20** Limãozinho; **21-22** Algaroba; **23-24** Umbu; **25-26** Canafístula; **27-28** Pinha; **29-30** Laranja; **31-32** Feijão Bravo.

AMOSTRAS DE DNA	CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS (ng/μL)	A260/280	A260/230
1	1634,4	2,07	2,15
2	4085,3	2,13	2,15
3	1263,3	2,05	1,99
4	657,6	1,94	1,58
5	2671,9	1,35	0,94
6	2355,7	1,16	0,93
7	280,7	1,30	0,58
8	178,5	1,33	0,48
9	5494,5	1,85	1,71
10	1145,8	1,87	1,23
11	2290,8	1,91	1,80
12	800,2	1,86	1,77
13	1162,1	1,91	1,70
14	139,6	1,57	0,77
15	4893,1	1,98	1,87
16	936,0	1,20	0,74
17	14521,5	2,08	1,83
18	4928,0	2,07	1,84
19	2567,5	2,00	2,20
20	1531	1,98	2,15
21	5499,4	2,10	2,13
22	1774,3	1,98	1,44
23	6192,0	2,09	1,93
24	140,7	1,43	0,56
25	8925,1	2,03	1,79
26	528,6	2,08	1,97
27	209,3	1,63	0,75
28	169,8	1,93	1,18
29	4461,5	1,97	1,77

Continuação da tabela 4

AMOSTRAS DE DNA	CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS (ng/μL)	A260/280	A260/230
30	1302,7	1,86	1,69
31	2326,7	1,97	1,53
32	1560,7	2,06	2,01

Fonte: Dados da Pesquisa.

A partir dos dados da Tabela 4 foi possível observar a grande concentração de ácidos nucleicos presente nas amostras, contradizendo, dessa forma, os resultados da eletroforese. Uma justificativa seria o fato do espectrofotômetro quantificar tanto o DNA integro quanto DNA degradado e, ainda, contaminações com RNAs presentes na amostra. Algumas amostras apresentaram um grau de pureza relativamente próximo do ideal. As medições de absorbância foram realizadas a 260 nm e 280 nm, onde a razão entre as absorbâncias 260/280 nm determinam a pureza das amostras de ácidos nucleicos. As amostras com um grau de pureza elevado apresentaram uma razão 260/280 entre 1,8 e 2,0, nas amostras com razão superior a 2,0 ocorreu contaminação com RNA. Para os valores inferiores a 1,8 ocorreu contaminação com proteínas, as quais absorvem luz no comprimento de onda de 280 nm. Dessa forma, a razão 260/280 estabelece um parâmetro de avaliação da qualidade das amostras de ácidos nucleicos.

A concentração de DNA nas amostras extraídas com o protocolo CTAB apresentou média de 4024,6 ng/μl, com razão entre as leituras das absorbâncias 260/280 entre 1,30 e 2,10, onde 7 das amostras apresentaram um grau de pureza satisfatório, correspondente as seguintes espécies: *Caesalpinia pyramidalis* - 1,91; *Capparis flexuosa L* - 1,97; *Citrus aurantium* - 1,97; *Schinopsis brasiliensis* - 1,91; *Solanum paniculatum L* - 1,85; *Syzygium cumini* - 1,98; *Zanthoxylum stelligerum* - 2,00. Já para a concentração de DNA nas amostras extraídas com o protocolo SDS o rendimento médio foi de 1389,6 ng/μl, no entanto, a razão entre as leituras 260/280 variou entre 1,16 e 2,08. Para este protocolo as amostras que apresentaram um bom resultado correspondem as espécies: *Annona Squamosa* - 1,93; *Caesalpinia pyramidalis* - 1,86; *Citrus aurantium* - 1,86; *Prosopis juliflora* - 1,98; *Solanum paniculatum L* - 1,87; *Zanthoxylum stelligerum* - 1,98; *Ziziphus joazeiro* - 1,94. Um total de 10 amostras apresentaram contaminação por RNA, sendo 6 do protocolo CTAB e 4 do protocolo SDS. Das 8 amostras com contaminação por proteína, 3 foram extraídas pelo protocolo CTAB e 5 pelo SDS. Observa-se que as maiores concentrações de DNA foram obtidas das amostras extraídas pelo



protocolo CTAB, demonstrando sua eficiência, apesar das contaminações por carboidrato, RNA e proteína.

### 5.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os testes preliminares sobre a qualidade dos DNAs isolados para amplificar fragmentos gênicos do tipo PR-5 por meio de PCR não foram bem sucedidos (dados não mostrados). Os primers utilizados foram desenhados para anelamento em putativos genes PR-5 com homólogos a genes de plantas da família Solanaceae (PPS1/PCTP1), descritos por Campos et al. (2002). Outras combinações de primers específicos para genes *PR-5* disponíveis no LBIotec foram utilizadas para testar a amplificação de genes completos que foram utilizadas e suas posições nas regiões dos genes que codificam proteínas PR-5 estão indicados na Figura 7.

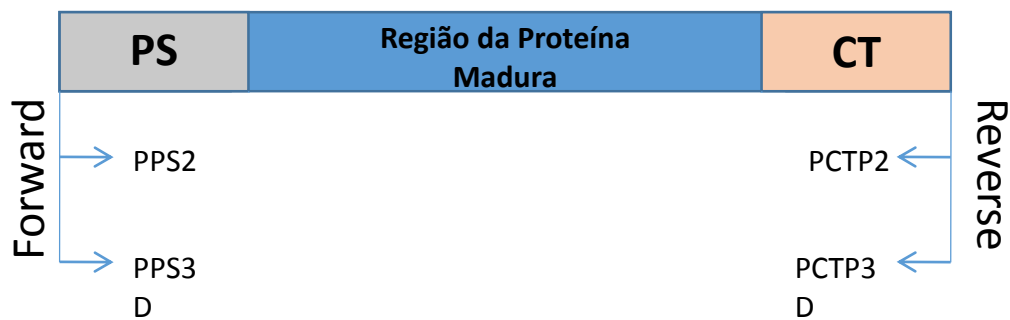


Figura 7: Demonstração esquemática indicando a posição e direção dos primers utilizados para amplificar a região codificadora de genes *PR-5*, a qual codifica a proteína completa (Peptídeo sinal, região madura e carboxi-terminal). PS, peptídeo sinal (início do gene); CT, carboxi-terminal (final do gene); D, degenerado.

As amostras foram aplicadas em gel de agarose para a visualização de amplicons, no entanto, não ocorreu amplificação de nenhum fragmento de DNA utilizando a combinação de primers PPS1/PCTP1 e PPS2/PCTP2. Por esse motivo, foi realizada uma PCR teste com alguns componentes de PCR do Laboratório de Biotecnologia: enzimas, os tampões e os primers PPS1/PCTP1, PPS2/PCTP1, PPS3/PCTP1 e PPS3/PCTP2, utilizando como amostra controle o DNA da planta Maria Pretinha. Depois da análise em gel de agarose, foi comprovado o funcionamento das enzimas, no entanto, não houve amplificação para as seguintes combinações de primers: PPS1/PCTP1 e PPS3/PCTP2.

Em seguida, uma PCR teste para diferentes combinações de primers para amplificar fragmentos de genes *PR-5*, disponíveis no LBIotec, foi realizada usando os DNAs de Jurema Preta, Algaroba e Caju, entretanto sem sucesso, exceto para o par de primer de região

conservada NP1/P5 usando o DNA de Jurema Preta (FIGURA 8). Pode ser que todos os primers do LBiotech utilizados estejam degradados, visto que em outros dois géis foi confirmada a presença de DNAs.

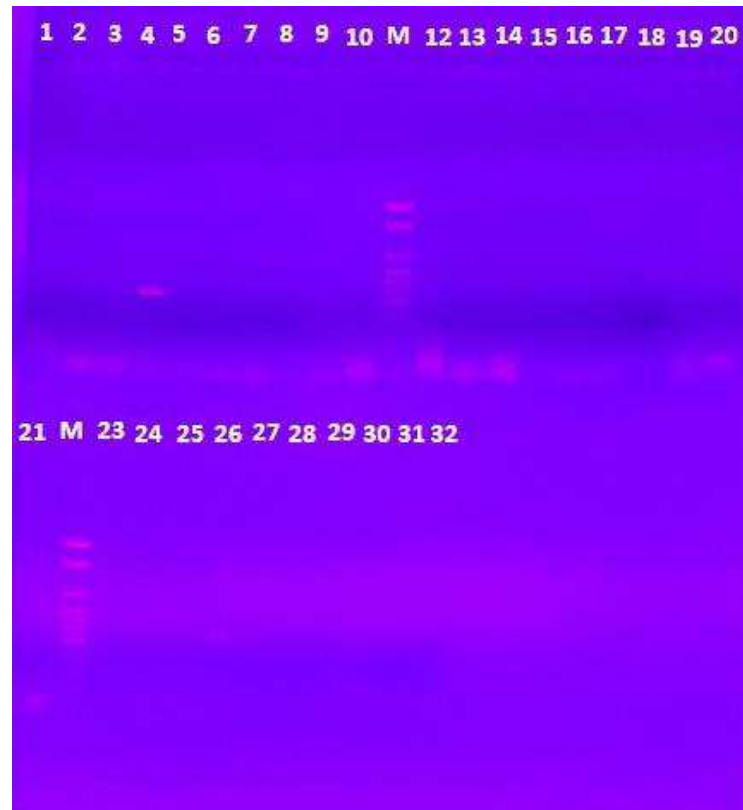


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos da PCR teste para diferentes combinações de primers: **1-** PPS1/PCTP1; **2-** PPS1/PPM2; **3-** PPM1/PPM2; **4-** NP1/P5; **5-** NP1/P4; **6-** NP1/JP3R; **7-** NP1/P2R; **8-** NP1/P1R; **9-** AP24/AP24R; **10-** PPM1/P5. Utilizando os DNAs de **1-10:** Jurema Preta; **12-21:** Algaroba; **23-32:** Caju.

### 5.3 Busca e caracterização *in silico* de genes PR-5 de famílias de plantas do semiárido Paraibano

A busca por genes *PR-5* disponíveis em bancos de dados públicos foi direcionada para 13 famílias de espécies de plantas já descritas no semiárido paraibano (LIMA, 1996; MAIA, 2004; SAMPAIO et al., 2003): Fabaceae, Caesalpiniaceae, Cactaceae, Euphorbiaceae, Bromeliaceae, Heretiaceae, Capparaceae, Anacardiaceae, Bignoniaceae, Combretaceae, Mimosaceae, Rhamnaceae, Verbenaceae. Entretanto, para seis destas famílias botânicas (Capparaceae, Capparaceae, Anacardiaceae, Combretaceae, Mimosaceae, Rhamnaceae, Verbenaceae) não foram encontradas sequências de proteínas PR-5 no GenBank, usando como

palavras-chaves tentativas do nome da família *versus* diferentes denominações para proteínas PR-5 (thaumatin, osmotin, zeamatin, PR-5 protein, pathogenesis-related-5 protein).

Além destas, alguns genes *PR-5* bem caracterizados foram adicionados para embasar a análise dessa família de genes, a exemplo da sequência de um gene *PR-5* completo e a sequência de aminoácidos deduzida da proteína codificada por ele, representado na Figura 9.

```

1 atgagtcacttgataacttgtgtagtattccttccttcttgccttt
M S H L I T C V V F F L L A F
46 gtgacttataactcatgcttccggcgtatTTGAGGTCCATAACAAC
V T Y T H A S G V F E V H N N
91 tgcccatcacaccgtctggggcggcggcaaccctgtaggcggcggc
C P Y T V W A A A T P V G G G
136 cgacgcctcgagcggaggtcaaagctggtggttctgggcccaccg
R R L E R G Q S W W F W A P P
181 ggtactaaaatggcacgtatatggggcgtactaattgcaacttt
G T K M A R I W G R T N C N F
226 gatggtgcgggtagaggttgggtgtcaaaccggtgattgtggtgga
D G A G R G W C Q T G D C G G
271 gtcctagaatgcaaaggtggggtaaaccaccaaacactttagcc
V L E C K G W G K P P N T L A
316 gaatacgcattgaaccaattcagtaacttagatttctgggacatt
E Y A L N Q F S N L D F W D I
361 tctgtaatcgatggattcaacattcctatgtccttttggcccgact
S V I D G F N I P M S F G P T
406 aagcctggccctggaaaatgtcacggaattcaatgcacagctaata
K P G P G K C H G I Q C T A N
451 ataaatggtgaatgccctggtgcacttaggggtacctggaggatgt
I N G E C P G A L R V P G G C
496 aacaacccatgtacaacatttggaggacaacaatattgttgacaca
N N P C T T F G G Q Q Y C C T
541 caaggaccttgtggtcctacagagttatcaagatggttcaaaaa
Q G P C G P T E L S R W F K Q
586 agatgtcctgatgcctatagttatccacaagatgatccaacaagt
R C P D A Y S Y P Q D D P T S
631 acatttacatgcacaagttggactacagattataaggttatgtttc
T F T C T S W T T D Y K V M F
676 tgccttatggaagtgctcacaatgaaacaacaatttcccattg
C P Y G S A H N E T T N F P L
721 gagatgcctacaagtactcatgaagtggctaagtag 756
E M P T S T H E V A K *

```

Figura 9: Sequências de nucleotídeo e aminoácidos da PR-5d neutra isolada de *Nicotiana sylvestris* (número de acesso, BAA11180.1). Sombreamento indica a posição de interesse para desenho de *primers*. Sublinhado indica o peptídeo sinal predito pelo programa SignalP, na região N-terminal (início da proteína) e possível peptídeo carboxi-terminal (final da proteína).

Como resultado da busca por palavras-chaves, não foi encontrado nenhum depósito da proteína para as espécies, no entanto, um total de 62 sequências de proteínas osmotinas para o gênero *Solanum* foram obtidas no NCBI, pertencentes as espécies: *S. tuberosum*, *S. commersonii*, *S. phureja* e *S. lycopersicum*. As sequências foram analisadas quanto à similaridade com as sequências de proteínas de outros organismos, também depositadas no GenBank/NCBI, utilizando o programa Blastx como está demonstrado na Tabela 5. A partir da análise da tabela é possível observar a grande similaridade da Espécie *Capsicum annum* e *Nicotiana tabacum* com o gênero *Solanum*. Isto porque ambos os gêneros, *Solanum* e *Capsicum* são classificados na Família Solanaceae.

Tabela 5: Distribuição das sequências depositadas no Genbank/NCBI que apresentam similaridade com as sequências de nucleotídeos do gênero *Solanum*.

<b>NOME DAS PROTEÍNA</b>	<b>ORGANISMO</b>	<b>NÚMERO DE ACESSO</b>	<b>SIMILARIDADE</b>
PR5-like protein	<i>Capsicum annum</i>	ACB30367.1	179/180(99%)
Osmotin	<i>Nicotiana tabacum</i>	CAA46623.1	173/180(96%)
Neutral PR-5	<i>Nicotiana sylvestris</i>	BAA11180.1	163/181(90%)
Thaumatococcus-like protein	<i>Actinidia chinensis</i>	AGC39177.1	146/177(82%)
Osmotin-like protein	<i>Hevea brasiliensis</i>	AHA83528.1	146/182(80%)
At4g11650	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAQ22606.1	143/178(80%)
Osmotin-like protein	<i>Gossypium hirsutum</i>	AAQ14497.1	140/179(78%)

Fonte: GenBank/NCBI

Embora *Hevea* pertença a família Euphorbiaceae, *Gossypium* a Malvaceae e *Arabidopsis* a Brassicaceae, com gêneros distantemente relacionados, observou-se que existe uma elevada similaridade entre elas e com as sequências de Solanaceae. Esta informação revela que genes PR-5 são conservados em plantas de famílias e gêneros diferentes com similaridade acima de 70%, o que fortalece a hipótese de que é possível desenhar primers que sejam capazes de anelar em sequências de espécies vegetais distantes filogeneticamente.

Dentre as sequências de nucleotídeos e proteínas PR-5 de *Solanum* encontradas, quatro foram selecionadas aleatoriamente e submetidas ao alinhamento múltiplo, através do programa ClustalW. Este alinhamento foi realizado em grupo, tanto para proteínas (FIGURA 10) quanto para nucleotídeos (FIGURA 11), com uma sequência de cada espécie. Essas análises foram realizadas visando demonstrar as regiões conservadas nas sequências de proteínas PR-5 e a alta

similaridade entre elas, bem como visualizar a degeneração no código genético nas sequências de nucleotídeos, importante no caso do desenho de primers.

Na Figura 10 foi possível identificar as 16 cisteínas formadoras de pontes de hidrogênio, conservadas na proteína PR-5d de *Nicotiana sylvestris*.

```

SCOSM      MGYLRSSFIFSLLEAFVITYTYAATIEVRNNCPYTVWAASTPIGGRRRLNKGQTWVINAPRG
STOSM81    MGYLRSSFIFSLLEAFVITYTYAATIEVRNNCPYTVWAASTPIGGRRRLNKGQTWVINAPRG
SPOSM      MAYLRSSFVFFLLAFVITYTYAATIEVRNNCPYTVWAASTPIGGRRRLDRGQTWVINAPRG
          * . ***** : * ***** : ***** : ***** : ***** : *****
          * . ***** : * ***** : ***** : ***** : ***** : *****

SCOSM      TKMARIWGRTGCFNFAAGRGSCQGTGDCGGVLLCTGWGKPPNTLAEYALDQFSNLDFWDIS
STOSM81    TKMARIWGRTGCFNFAAGRGSCQGTGDCGGVLQCTGWGKPPNTLAEYALDQFSNLDFWDIS
SPOSM      TKMARIWGRTNCFNFDGAGRGSCQGTGDCGGVLQCTGWGKPPNTLAEYALDQFSNLDFWDIS
          ***** . *** : . ***** ***** ***** *****

SCOSM      LVDGFNIPMTFAPTKPSAGKCHAIHCTANINGECPRALKVPGGCANNPCTTFGGQQYCCTQ
STOSM81    LVDGFNIPMTFAPTKPSAGKCHAIHCTANINGECPRALKVPGGCANNPCTTFGGQQYCCTQ
SPOSM      LVDGFNIPMTFAPTNPSGGKCHAIHCTANINGECPGSLRVPGGCANNPCTTFGGQQYCCTQ
          ***** : ** . ***** : * : *****

SCOSM      GPCGPTELSKFFKKRCPDAYSYPQDDPTSTFTCPGGSTNYRVVFCPNGVADPNFPLEMPA
STOSM81    GPCGPTELSKFFKKRCPDAYSYPQDDPTSTFTCPGGSTNYKVVFCPNGVADPNFPLEMPA
SPOSM      GPCGPTDLRFFKQRCPDAYSYPQDDPTSTFTCPGGSTNYRVVFCPNGVTSPNFPLEMPA
          ***** : ** : *** : ***** : ***** : ***** : ***** :

SCOSM      STDEVAK
STOSM81    STDEVAK
SPOSM      SDEEAK-
          * : * .

```

Figura 10: Alinhamento das sequências de proteínas osmotinas do gênero *Solanum*, usando o programa ClustalW (Version 2.1, <http://www.genome.jp/tools/clustalw/>). Asteriscos indicam aminoácidos idênticos. As 16 cisteínas conservadas em PR-5, envolvidas em oito pontes de sulfeto (C-C), estão indicadas por sombreado.

Na Figura 11, apesar da degeneração do código genético, o alinhamento dos nucleotídeos na região de ORF, do start ao stop códon, revelou a grande identidade entre as sequências no início do gene e no final, indicando que neste caso dessas espécies de *Solanum* primers poderiam ser desenhados com possibilidades de sucesso no anelamento com os genomas de *Solanum* de espécies do Semiárido Paraibano. No entanto, no caso de desenho de primers para isolamento de genes entre famílias botânicas distantemente relacionadas precisa ser investigado, revelando a importância deste trabalho em estudar e explorar melhor o bioma Caatinga.

```

STOSM81      ATGGGCTACTTGAGATCTTCTTTTATTTTCTCCCTTCTTGCTTTTGTGACTTACACTTAT
SPOSM        ATGGCCTACTTGAGATCTTCTTTTGTFTTCTTCCCTCCTTGCTTTTGTGACTTACACTTAT
SCOSM        ATGGGCTACTTGAGATCTTCTTTTATTTTCTCCCTTCTTGCTTTTGTGACTTACACTTAT
              ****  *****  *****  ***  *****  *****
STOSM81      GCTGCCACTATCGAGGTACGCAACAACACTGTCCATACACCGTGTGGGCAGCATCGACCCCG
SPOSM        GCTGCCACTATCGAGGTACGCAATAACTGTCCATACACCGTGTGGGCAGCATCGACCCCG
SCOSM        GCTGCGACTATCGAGGTACGCAACAACACTGTCCATACACCGTGTGGGCAGCATCGACCCCG
              *****  *****  *****  *****  *****
STOSM81      ATAGGCGGTGGTTCGACGTCTCAATAAGGGCCAAACATGGGTCATCAATGCTCCAAGGGGA
SPOSM        ATAGGCGGTGGCCGACGTCTCGATCGAGGCCAGACATGGGTTATCAATGCGCCGAGGGGC
SCOSM        ATAGGCGGTGGTTCGACGTCTCAATAAGGGCCAAACATGGGTCATCAATGCTCCAAGGGGA
              *****  *****  .*. .*. *****  *****  *****  **  *****  .
STOSM81      ACAAAGATGGCAGCTATATGGGGTTCGACTGGTTGTAACCTTCAATGCTGCAGGCAGGGGT
SPOSM        ACTAAGATGGCAGCTATATGGGGTTCGACTAATTGCAACTTTGATGGTGTGTTAGAGGT
SCOSM        ACTAAGATGGCAGCTATATGGGGTTCGACTGGTTGTAACCTTCAATGCTGCAGGAAGGGGT
              **  *****  *****  .*. *****  .**  ***  **  *  *  *  *
STOSM81      TCGTGTGACACTGGTGATTGTGGTGGAGTCTTGCAGTGTACCGGTTGGGGCAAGCCCCCA
SPOSM        TCATGCCAGACTGGTGATTGTGGTGGGGTCTTGCAGTGTACCGGTTGGGGCAAACCACCA
SCOSM        TCGTGTGACACTGGTGATTGTGGTGGAGTCTTGTCTGTGTACCGGTTGGGGTAAGCCCCCA
              **  *  *****  *****  .*****  .*****  *****  **  *  *  *  *
STOSM81      AACACCTTGGCTGAATATGCCTTGGATCAGTTTAGCAACCTAGATTTCTGGGATATTTCT
SPOSM        AACACCTTGGCTGAATATGCCTTGGACAGTTCAGCAACCTAGATTTCTGGGACATTTCT
SCOSM        AACACCTTGGCTGAATATGCCTTGGATCAGTTTAGCAACCTAGATTTCTGGGATATTTCT
              *****  *****  *****  *****  *****  *****  *****
STOSM81      TTAGTTGACGGATTCAATATTTCCAATGACTTTTGCCTTACCAACCTAGTGCTGGGAAA
SPOSM        TTAGTCGATGGATTAAATATTTCCGATGACTTTTGCCTTACCAACCTAGTGCTGGGAAA
SCOSM        TTAGTTGACGGATTCAATATTTCCAATGACTTTTGCCTTACCAACCTAGTGCTGGGAAA
              *****  **  *****  *****  .*****  *****  *****  .*****  .*****
STOSM81      TGCCATGCAATCCATTGCACGGCCAATATAAATGGTGAATGTCTCGCGCCCTTAAGGTA
SPOSM        TGCCACGCAATTCATTGCACGGCTAATATAAATGGTGAATGTCTCGCTTACTTAGGGTA
SCOSM        TGCATGCAATTCATTGCACGGCCAATATAAATGGTGAATGTCTCGCGCCCTTAAGGTA
              **  *  *****  *****  *****  *****  *****  *  *  .*****  .*****
STOSM81      CCTGGAGGATGTAACAATCCTTGTACCACGTTTGGAGGACAACAATATGTTGCACCCAA
SPOSM        CCTGGAGGATGTAACAATCCTTGTACCACGTTTGGAGGACAACAATATCGTTGCACCCAA
SCOSM        CCTGGAGGATGTAACAATCCTTGTACCACGTTTGGAGGACAACAATATGTTGCACCCAA
              *****  *****  *****  *****  *****  *****  *****
STOSM81      GGTCATGTGGTCTTACAGAGTTGTCCAAATTTTCAAGAAAAGATGCCCGATGCTTAT
SPOSM        GGTCATGTGGTCTTACTGATTTGTCTAGATTTTCAACAAAAGATGCCCTGATGCTTAT
SCOSM        GGTCATGTGGTCTTACAGAGTTGTCCAAATTTTCAAGAAAAGATGCCCGATGCTTAT
              *****  *****  .**  *****  *  .*****  .  *****  *****  *****  ***
STOSM81      AGCTACCCACAAGATGATCCTACTAGCACATTTACTTGTCTGAGGAGTAGTACAAACTAT
SPOSM        AGCTACCCACAAGATGATCCTACTAGCACATTTACTTGCCTAGTGGTAGTACAAATAT
SCOSM        AGCTACCCACAAGATGATCCTACCAGCACATTTACTTGTCTGAGGAGTAGTACAAACTAT
              *****  *****  *****  *****  *****  *****  ***  *  .*****  *****  ***
STOSM81      AAGGTTGTCTTTTGTCCCAATGGCGTTGCTGATCCAAATTTCCCTTGGAGATGCCTGCA
SPOSM        AGGGTTGTCTTTTGTCCCAATGGTGTACTAGCCCAAATTTCCCTTGGAGATGCCTTCA
SCOSM        AAGGTTGTCTTTTGTCCCAATGGTGTGCTGATCCAAATTTCCCTTGGAGATGCCTGCA
              *  .*****  *****  *****  **  *  *  *  *  .*****  *****  *****  **
STOSM81      AGTACTGATGAAGTGGCCAAGTAA
SPOSM        AG---TGATGAAGAGGCTAAGTAA
SCOSM        AGTACTGATGAAGTGGCCAAGTAA
              **  *****  .***  *****

```

Figura 11: Alinhamento das sequências de nucleotídeos do gênero *Solanum*, usando o programa ClustalW. Asteriscos indicam nucleotídeos idênticos.

## 6. CONCLUSÕES

- É possível extrair DNAs genômicos de plantas do semiárido usando os protocolos de CTAB e SDS/Fenol, sendo o de CTAB mais eficiente;
- A quantidade e qualidade dos DNAs extraídos variam de acordo com os tecidos vegetais das espécies, com os protocolos e com os métodos de análises por eletroforese e espectrofotometria;
- O insucesso nas ampliações por PCR usando os DNAs extraídos e primers específicos para genes PR-5 deve ser mais em função da viabilidade dos primers utilizados do que devido a qualidade e quantidade dos DNAs extraídos;
- A ausência de depósitos de genes *PR-5* das espécies vegetais de Caatinga estudadas no GenBank revela a necessidade desse estudo de prospecção;
- Análises comparativas *in silico* de sequências de nucleotídeos e de proteínas PR-5 são fundamentais para o desenho de primers específicos funcionais.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABAD, L. R. et al. Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. **Plant Sci**, v. 118, p. 11-23, 1996.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathol**, 5th. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, p.922, 2005.
- ALMEIDA, B. et al. Drug-induced apoptosis in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1783, p. 1436–1448,2008.
- ANZLOVAR, S. et al. Membrane permeabilizing of pathogenesis-related protein linusitin from flax seed. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 7, p. 610-617, 1998.
- ARAÚJO, N. D. A era da bioinformática: seu potencial e suas implicações para as ciências da saúde. **Estud Biol**. p.143-148, 2008.
- ARBEX, W.; COSTA, V. M. M. S.; SILVA, M. V. G. B. Bioinformática como Ferramenta nas Pesquisas Atuais. In: III Encontro De Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa, 2006. **Anais...**Viçosa, 2006. p. 1-11. Disponível em: <[http://www.researchgate.net/publication/221875655\\_Bioinformtica\\_como\\_ferramenta\\_nas\\_pesquisas\\_atuais](http://www.researchgate.net/publication/221875655_Bioinformtica_como_ferramenta_nas_pesquisas_atuais)> Acesso em: 29 de Junho de 2014.
- BARBOSA, C. D. **Bioinformática e técnicas multivariadas na análise da divergência genética em *Carica papaya* L.** Campos dos Goytacazes – RJ, 2010.
- BARROS, F. C. et al. Indução De Resistência Em Plantas Contra Fitopatógenos. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 26, n. 2, p. 231-239, 2010.
- BARUFI, J. B. **Fotoproteção em *Gracilaria tebustipitata* (Rhodophyta):** Uma abordagem fisiológica e molecular. 2010. 325 f. Tese (Doutorado em Ciências) Instituto de Biociência, Departamento de botânica, Universidade de São Paulo, 2010.
- BONALDO, S. M. et al. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba: **FEALQ**, p. 11-28, 2005.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de Plantas**. Viçosa: UFV, p. 525, 2005.
- BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic Stress. In: B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, Eds. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. **American Society of Plant Physiologists**, p. 1158-1203, 2000.
- CALDAR, E. T. Análise comparativa de métodos de extração de DNA genômico de células do sangue e do leite de pequenos ruminantes. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39(1), p. 1-8, 2011.
- CAMPOS, M. A. et al. PR gene families os citrus: Their organ specific-biotic and abiotic inducible expression. Profiles based on ESTs approach. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30 (3), p. 917-930, 2007.



- CAMPOS, M. A. et al. Putative pathogenesis-related genes within *Solanum nigrum* var. *americanum* genome: Isolation of two genes coding for PR5-like proteins, phylogenetic and sequence analysis. **Physiol Mol Plant Pathol**, v. 61, p. 205-216, 2002.
- CANSANÇÃO, I. F.; COUTINHO, H. D. M. Estudo comparativo de dois métodos de extração de DNA genômico do Pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm). **Biofar, Rev. Biol. Farm**, v. 9, n. 1, p. 13-17, 2013.
- CARVALHO, N. L. Resistência Genética Induzida em Plantas Cultivadas. **Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 7, n° 7, p. 1379-1390, 2012.
- DURRANT, W. E. & DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 185-209, 2004.
- EL-KEREAMY, A. et al. *Prunus domestica* Pathogenesis-Related Protein-5 Activates the Defense Response Pathway and Enhances the Resistance to Fungal Infection. **PLoS ONE**, v. 6, p. 1-12, 2011.
- GARCION, C.; LAMOTTE, O.; MÉTRAUX, J. P. Mechanisms of defence to pathogens: biochemistry and physiology. **Oxford: Blackwell**, p.109-132, 2007.
- GOLÇALVES, G.S. **Estratégias de controle de invasão biológica por *Prosopis juliflora*, na Caatinga e ecossistemas associados**. 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Agranomia) – Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, Areia.
- GONÇALVES, J. S. P. **BiGGES TS - Biclustering Gene Expression Time-Series**. Graduation Thesis, University of Beira Interior, Covilhã-Portugal, 2007.
- GRENIER, J. et al. Some thaumatin-like proteins hydrolyse polymeric  $\beta$ -1, 3-glucans. **The Plant Journal**, v. 19, p. 473-480, 1999.
- IBEAS, J. I. et al. Fungal cell wall phosphomannans facilitate the toxic activity of a plant PR-5 protein. **The Plant Journal**, v. 23, p. 83-375, 2000.
- JUNG Y.C. et al. Drought-inducible-but ABA-independent-thaumatin-like protein from carrot (*Daucus carota* L.). **Plant Cell Reportes**, v. 24(6), p. 366-373, 2005.
- KAMOUN, S. A Catalogue of the Effector Secretome of Plant Pathogenic Oomycetes. **Rev. Phytopathol**, v. 44, p. 41–60, 2006.
- LIMA, J. L. S. Plantas forrageiras das Caatingas: usos e potencialidades. **EMBRAPA/CPATSA/PNE/RBG-KEW**. Petrolina (PE), p. 44, 1996.
- LOPES, D. S. A. A produção de insulina artificial através da tecnologia do DNA recombinante para o tratamento de *diabetes mellitus*. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações**, v. 10, n. 1, p. 234-245, 2012.

MAIA, G. N. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. 1. ed. São Paulo: D&Z **Computação Gráfica e Editora**, p. 413, 2004.

MARTINS, W. S. Bioinformática. Brasília: Associação Brasileira das Universidades Comunitárias. **Página mantida pela ABRUC**. 2007. Disponível em: <<http://www.abruc.org.br>> acesso em 06 de Julho de 2014.

MENU-BOUAOUICHE, L. et al. A molecular basis for the endo-beta 1,3-glucanase activity of the thaumatin-like proteins from edible fruits. **Biochemie**, v. 85, p. 123-131, 2003.

MOHAMED, E.O.; TRAPANI, A.; BOUARAB, K. The nature of tobacco resistance against Botrytis cinerea depends on the infection structures of the pathogen. **Environ Microbiol**, v.12, Issue 1, p. 239–253, 2010.

NARASIMHAN, M. L. et al. A plant defense response effector induces microbial apoptosis. **Molecular Cell**, v.8, p. 921-930, 2001.

NCBI. **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Acesso em: 26 de Junho de 2014.

NEWTON, S. S.; DUMAN, J. G. An osmotin-like cryoprotective protein from the bittersweet nightshade Solanum dulcamara. **Plant Molecular Biology**, v.44, p. 9-581, 2000.

NOGUEIRA, A. C. W. et al. An overall evaluation of the Resistance (R) and Pathogenesis-Related (PR) superfamilies in soybean, as compared with Medicago and Arabidopsis. **Genetics and Molecular Biology**, v.35, p.260-271, 2012.

OLIVEIRA, K. C. **Genotypic characterization of arrays of coffee plants and their clonal progeny obtained by somatic embryogenesis**. Thesis (Master in Genetic, Plant Breeding and Biotechnology) – Post Graduate – CAI, p. 72, 2012.

OLIVEIRA, M. C. S. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. **Embrapa Pecuária Sudeste**, p. 1-38, 2007.

PASCHOLATI, S. F.; CIA, P. Mecanismos bioquímicos na resistência de plantas às doenças, 2005. **Anais...** Disponível em: <[http://www.ipni.net/ppiweb/pbrazil.nsf/926048f0196c9d4285256983005c64de/6fedf99345c5f6903256fdd004bf038/\\$FILE/Anais%20Sergio%20Pascholati.pdf](http://www.ipni.net/ppiweb/pbrazil.nsf/926048f0196c9d4285256983005c64de/6fedf99345c5f6903256fdd004bf038/$FILE/Anais%20Sergio%20Pascholati.pdf)>. Acesso em: 20 de Abril de 2014.

PASCHOLATI, S.F. et al. Interação planta-patógeno. Fisiologia, bioquímica e biologia molecular. Piracicaba, **FEALQ**, p.179-197, 2008.

ROCHA, W. F. et al. Levantamento da cobertura vegetal e do uso do solo do Bioma Caatinga. **Anais XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Florianópolis, INPE**, p. 2629-2636, 2007.

ROJAS, C. M. **Papel de los reguladores moleculares Fbp1 y Bmh2 en la virulencia de *Fusarium oxysporum***. 2014. 179 f. Tesis (Doctor en Biología) - Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba, Córdoba 2014.

SAMPAIO, E. V. S.; GAMARRA-ROJAS, C. F. L. A vegetação lenhosa das ecorregiões da Caatinga. Pp. 85-90. In: E.A.G. Jardim; M.N.C. Bastos & J.U.M. Santos (eds.). Desafios da Botânica brasileira no novo milênio: inventário, sistematização e conservação da diversidade vegetal. **Sociedade Brasileira de Botânica**, Belém, 2003.

SANTOS, A. et al. Comparison of methods of DNA extraction for real-time PCR in a model of pleural tuberculosis. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 118(1), p. 60-65, 2009.

SAROWAR S. et al. Overexpression of a pepper basic pathogenesis-related protein 1 gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses. **Plant Cell Reports**, v. 24, p. 216-224, 2005.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular. Piracicaba: **FEALQ**, p.227-248, 2008.

SILVA, M. A. P.; MEDEIROS FILHO, S. Morfologia de fruto, semente e plântula de piqui (*Caryocar coriaceum* Wittm.). **Revista de Ciência Agrárias**, v. 37, p. 320-325, 2006.

SILVA, R. M. A. Bancos de dados: arquitetura e utilização. Apostila de curso. **Bioinformática: do sequenciamento a função biológica**. Lavras, 2006.

SINHA, M. et al. Current Overview of Allergens of Plant Pathogenesis Related Protein Families. **The Scientific World Journal**, p. 1-19, 2014.

SOLLÉRO, B. P. Método rápido de extração de DNA utilizando CTAB em tecidos musculares de suínos. **AZOO-DF**, p. 1-4, 2004.

STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, número 1, p 18-46, 2011.

TAKAHASHI, W. et al. Increased resistance to crown rust disease in transgenic Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) expressing the rice chitinase gene. **Plant Cell Rep**, V. 23, p.811-818, 2005.

VAN LOON, L. C.; VAN KAMMEN, A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". Changes in protein constitution after infection with TMV. **Virology**, v.40, p.199-211, 1970.

VAN LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review Phytopathology**, v.114, p. 135-162, 2006.

VERA, R. Caracterização física e química de frutos do pequi ( *Caryocar brasiliense* Camb) oriundos de duas regiões no estado de Goiás, Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, p. 93-99, 2007.

WIECZOREK, E. M.; LEAL, E. **Caminhos e Tendências do Uso de Banco de Dados em Bioinformática**. In: IV Encontro de Estudantes de Informática do Estado do Tocantins. Palmas -TO, 2002. **Anais...** Palmas, 2002. Disponível em: <[http://www.wieczorek.com.br/publicacoes/artigo\\_IVencoinfo.pdf](http://www.wieczorek.com.br/publicacoes/artigo_IVencoinfo.pdf)>. Acessado em: 29 de junho de 2014.

YUN, D. J. et al. Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, U. S. A, v. 94, p. 7082-7087, 1997.

ZATZ, M.M. Bioinformatics training in the USA. **Briefings in Bioinformatics**, v. 3, n. 4, p. 353-360, 2002.