



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
UNIDADE ACADÊMICA DE BIOLOGIA E QUÍMICA
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

AMANDA FELICIANO DA COSTA

PROSPECÇÃO DE GENES *PR-5* EM *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Smith

CUITÉ – PB

2018

AMANDA FELICIANO DA COSTA

PROSPECÇÃO DE GENES *PR-5* EM *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Campina Grande, *Campus Cuité*, como requisito parcial para obtenção do Grau de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Magnólia de Araújo Campos

CUITÉ – PB

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Rosana Amâncio Pereira – CRB 15 – 791

C837p Costa, Amanda Feliciano da.

Prospecção de genes PR-5 em *amburana cearensis* (Allemão) A.C.Smith. / Amanda Feliciano da Costa. – Cuité: CES, 2018.

39 fl.

Monografia (Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2018.

Orientadora: Magnólia de Araújo Campos.

1. Genes de defesa. 2. PCR. 3. Extração de DNA. 4. *Amburana cearensis*. I. Título.

Biblioteca do CES - UFCG

CDU 57

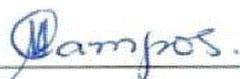
AMANDA FELICIANO DA COSTA

**PROSPECÇÃO DO GENE *PR-5* EM *Amburana cearensis* (Allemão)
A.C.Smith**

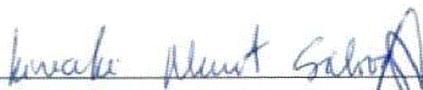
Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, *Campus Cuité*, para obtenção do grau de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dra. Magnólia de Araújo Campos
(Orientadora– UFCG / CES)



Prof.^a Dra. Kiriaki Nurit-Silva
(Membro Titular - UFCG / CES)



Prof. Dr. Marcus José Conceição Lopes
(Membro Titular - UFCG / CES)

À Deus pela força e determinação que me concede todos os dias, e aos meus queridos pais pelo apoio e amor incondicional, ensinando-me a viver sem medos e a buscar meus sonhos com garra e fé.

AGRADECIMENTOS

À Deus primeiramente por estar sempre iluminando meus caminhos de todas as formas possíveis, me guiando e com certeza me fazendo a cada dia alguém melhor, me mostrando seu amor e me protegendo sempre e em todo lugar, não esquecendo da minha mãezinha Maria santíssima que foi minha fiel amiga em todos os momentos.

Aos meus pais Jurandir e Elma por idealizarem esse sonho junto comigo, me proporcionando todo suporte que eu precisei e sendo minha base, meu aconchego, dividindo as preocupações, estando sempre presentes nos piores e melhores momentos, me amando incondicionalmente e me fazendo acreditar que eu poderia conseguir alcançar meus objetivos mesmo com tantas adversidades pelo caminho, à vocês eu dedico estes 5 anos de luta mas, que culminou em uma grande vitória: sua primeira filha formada. Eu amo muito vocês!

Aos meus irmãos João Pedro e Jéssica Gabrielly por todo incentivo e ajuda, essencialmente você Jéssiquinha, que foi e é meu abraço apertado na volta pra casa, minha caixinha de segredos, por muitas vezes minha irmã mais velha e meu apoio em todos os momentos da vida. Vocês são meu tesouro!

À minha família pela contribuição direta ou indireta na minha formação, em especial a minha tia/madrinha Maria dos anjos (*in memoriam*) por toda sua dedicação e cuidado para comigo, sei que de onde quer que esteja está olhando por mim e feliz com minha conquista. À Neuma e sua família que me adotou como uma filha na cidade de Cuité, minhas duas avós Maria e Lindalva pelo apoio, primos, tios e todos aqueles que estiveram presentes durante esses cinco anos.

À Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde-CES, Cuité-PB, por oferecer um ensino de qualidade, a coordenação do curso de Ciências Biológicas e a todos os professores pela transmissão de conhecimento, especialmente à Maria Franco, Márcio Frazão, Thamara Azevedo, Thayana e Magnólia Araújo por terem sido meus melhores exemplos e inspiração no curso, e aos demais servidores que contribuíram de alguma forma na minha vida acadêmica.

À minha orientadora profa. Dra. Magnólia de Araújo Campos por acreditar em mim e me incentivar sempre, muito obrigada por todos os ensinamentos acadêmicos e pessoais, com a senhora aprendi coisas muito além dos muros da universidade, sempre me contagiando com sua fé, me fazendo retomar a minha. Que Deus e nossa senhora possam lhe pagar com as melhores coisas dessa vida.

À minha querida banca examinadora: Kiriaki Nurit, Marcus Lopes e Igor Silva por aceitarem meu convite e dividirem esse momento tão importante na minha vida acadêmica, além das grandes contribuições para minha formação docente ao longo do curso.

À minha equipe do PIBID por todo aprendizado durante dois anos em especial a professora Jacilda Macêdo por todas as contribuições para minha futura carreira docente, aprendi nesses dois anos que ser professor vai muito além da sala de aula e que quando a gente faz as coisas com amor os resultados vem com certeza, devo tudo isso à você minha querida supervisora, serei eternamente #ficaPIBID.

À minha grande inspiração como aluna e professora extremamente dedicada e competente, Thamara Azevedo por toda amizade e ajuda desde a escolha do tema de TCC até procedimentos no laboratório vou ser eternamente grata e estarei sempre torcendo por suas conquistas, você é um ser humano ímpar.

À Flávia Beatriz por ter sido minha amiga de todas as horas em todos aspectos da minha vida, sempre me incentivando e mostrando o que há de melhor em mim que muitas vezes até eu esqueço. Você é aquela amizade que eu quero levar pra vida toda, ficarmos velhinhas e eu te pedindo conselhos (nunca vou deixar de te dar trabalho rsrs) TE AMO!

Aos meus amigos Jucielly Micaele e Arley Ribeiro que estiveram sempre me apoiando, estivemos juntos desde a quinta série entre brigas e muito amor. Essa vitória também é dedicada a vocês que estarão sempre em meu coração.

Aos meus colegas de turma que caminham junto comigo desde 2013: Gleisemere, Lucivânia, Kaline, Jeferson, Erika, Mairis, Johnatas Henriques, Nayan,

Ana de Paula, Josiene, Cileide Júnior e Salomão. A Darlene (amizade desde o primeiro dia) e sua mãe dona Maria José que me acolheram durante um bom tempo em sua casa, minha querida Thaisa que foi uma irmã juntamente com sua mãe Dona Cícera que sempre me presenteiam com um café delicioso e ótimas conversas, Ramana que foi minha parceira desde sempre, meu carinho admiração e respeito serão eternos. Às minhas parceiras de casa Izaíra e Olívia por cada conversa reconfortante de apoio, risadas e aperreios compartilhados. Vocês também são parte dessa conquista.

As amizades que conquistei ao longo desses cinco anos em Cuité: Primeiramente minha queridíssima amiga Laíla, criamos um laço muito forte de amizade, companheirismo e irmandade, obrigada por viver tantos perrengues e vitórias junto comigo, seu coração é do tamanho do mundo. À Henrique Handson por ter sido um irmão pra mim nos últimos dois anos, foi uma honra conhecer alguém tão íntegro e especial. Ao meu grupo maravilhoso (A.P) que faz meus dias mais felizes sempre, em especial Cleiton, Fernanda, Lucas e Diele. Jamais me esquecerei de vocês e ainda volto pra ser cuiteense se Deus quiser! Vocês moram em meu coração!

As meninas do Lbiotec em especial Kelly, Talita e Graciele com quem tive mais proximidade. Obrigada por cada momento juntas, cada experiência trocada, cada aprendizado, por passarmos tantos aperreios e sempre estarmos torcendo umas pelas outras. Kelly sem palavras pra te agradecer por seus ensinamentos, sempre com muita paciência e cuidado. Talita e Graci por serem sempre minha injeção de ânimo. Vocês são 10!

Gostaria muito de agradecer aqui a todos, um a um, mas tão importante quanto a gratidão é o reconhecimento. Obrigada a todos pela contribuição, ensinamentos, respeito, amparo, amizade e por cada sorriso que confortou meu coração nos momentos difíceis.

*"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota."*

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Genes que codificam proteínas PR-5 possuem importância para aplicações biotecnológicas por apresentar relevante atividade antimicrobiana e conferem resistência a estresses bióticos e abióticos. Estudos genômicos em plantas do Semiárido são escassos, embora os genes dessas plantas estejam evolucionamente adaptados à região e tenham um grande potencial para utilização em programas de melhoramento molecular de plantas. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi prospectar genes *PR-5* em cumaru *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm, por se tratar de uma planta típica da caatinga, bastante conhecida por seu uso medicinal e madeireiro, porém geneticamente pouco estudada. Para isso, DNA total de cumaru foi extraído a partir de folhas jovens, usando o protocolo de extração de CTAB; a quantidade e qualidade do DNA extraído foram analisadas por meio de leitura em espectrofotômetro e eletroforese em gel de agarose; DNA de cumaru foi amplificado por meio de reações em cadeia da polimerase (PCR) com diferentes combinações de primers específicos para genes que codifiquem proteínas PR-5. Como resultados, o protocolo de CTAB utilizado foi eficiente para a extração de DNA cumaru. O DNA de cumaru extraído foi amplificável por PCR, gerando fragmentos de tamanhos esperados para genes *PR-5*. Os amplicons de tamanhos esperados para genes completos do tipo *PR-5* necessitam ser purificados e sequenciados, visando comprovar a presença dos mesmos, e é a continuidade desde trabalho.

Palavras-chave: Genes de defesa. PCR. Extração de DNA. *Amburana cearensis*.

ABSTRACT

Genes encoding PR-5 proteins are important for biotechnological applications because they present antimicrobial activity and confer resistance to biotic and abiotic stresses. Genomic studies on Semiarid plants are scarce, although the genes of the plants are evolutionarily adapted to the region and have great potential for use in plant molecular breeding programs. In this context, in this work was aimed to prospect *PR-5* genes in a typical plant of the caatinga, *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm, well known for its medicinal and wood use, but genetically little studied, by PCR using specific primers. For this, total DNA was purified from coumaru young leaves, using the CTAB extraction protocol; The amount and purity of DNA extracted were analyzed by spectrophotometer reading and agarose gel electrophoresis; and Coumaru DNA was amplified by the polymerase chain reaction (PCR) with different combinations of primers specific for genes encoding PR-5 proteins. As results, the CTAB protocol was efficient for an extraction of DNA coumaru. The extracted coumaru DNA was amplifiable by PCR, generating fragments of expected length for *PR-5* genes. The expected in length amplicons for complete *PR5*-like genes need to be purified and sequenced, aiming to prove the presence of the genes, and it is the theme for the next steps of this work.

Keywords: Defense genes. PCR. DNA extraction. *Amburana cearensis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vista parcial do Horto Florestal Olho D'água da Bica, onde foram coletadas as folhas da planta <i>A. cearensis</i>	23
Figura 2. Planta <i>Amburana cearensis</i> (Allemão) A.C.Sm em período de estiagem. .	24
Figura 3- (A) Etapa da extração de DNA onde acontece a separação de ácidos nucleicos das proteínas; (B) Visualização do novelo de DNA da espécie <i>Amburana cearensis</i> (Allemão) A.C.Sm.	25
Figura 4: Equipamento de eletroforese horizontal em funcionamento acoplado a uma fonte de eletroforese.	26
Figura 5: Termociclador (Applied Biosystems) onde foram realizadas as reações em cadeia da polimerase.	29
Figura 6- Eletroforese em gel de agarose 1% de amostras de DNA de <i>A. cearensis</i> extraído pelo método de CTAB. (A) Primeira extração (B) Segunda extração.	31
Figura 7: Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos de PCR utilizando o DNA extraído de <i>A. cearensis</i> com as seguintes combinações de primers: PPS1/PCTP2 (1); PPS2/PCTP2 (2); PPS2/PCTP3 (3); PPS3/PCTP2 (4) PPS3/PCTP3 (5); NP1/PCTP2 (6). Controle negativo (7) para água e primers; Controle positivo utilizando o gene PR-5 PaOLP, isolado de <i>Physalis angulata</i> (1-6). A seta indica o tamanho aproximado de 700 pb.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 2: Sequências dos Primers utilizados na PCR	28
Tabela 3: Medições espectrofotométricas do mix de amostras de DNA de cumaru extraídas por CTAB, por meio de espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo scientific).	31

LISTA DE ABREVIATURAS

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
LBiotec	Laboratório de Biotecnologia
PCR	Do inglês, Polymerase Chain Reactions
Proteínas PR	Do inglês, Pathogeneses-related
PVP	Do inglês, Polyvinyl Pyrrolidone
Tris-HCl	Tris (hidroximetil) aminometano-Clorídric
µL	Microlitros
mL	Mililitros
RPM	Rotações por minuto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
2.3 Objetivos Acadêmicos.....	17
3. REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1 Proteínas relacionadas com a patogênese	18
3.2 Proteínas PR-5.....	19
3.3 Extração de DNA genômico total de plantas do Semiárido.....	20
3.4 A planta <i>Amburana cearensis</i> (Allemão) A.C.Smith.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Coleta e caracterização da planta com características genômicas importantes no horto florestal do CES	23
4.2 Extração de DNA total de cumaru utilizando protocolo de CTAB	24
4.3 Eletroforese horizontal utilizando gel de agarose.....	25
4.4 Quantificação de DNA em espectrofotômetro	26
4.5 Reações em Cadeia da Polimerase (PCR).....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 Análise da integridade do DNA genômico de <i>Amburana cearensis</i> por meio de eletroforese horizontal em gel de agarose	30
5.2 Análise da quantidade e pureza do DNA por Espectrofotometria	31
5.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	32
6. CONCLUSÃO	34

1. INTRODUÇÃO

Plantas e animais possuem mecanismos de defesa naturais em seu sistema imunológico inato, que podem ser estimulados tais como as proteínas de defesa (de *Pathogenesis-Related*) ou proteínas PR (LINCOLN et al., 2018). Essas proteínas possuem atividade antimicrobiana, e antifúngica bastante atraente para engenharia genética por conferir resistência mediada pela expressão constitutiva de genes PR em plantas transgênicas. Elas acumulam-se em locais remotos não infectados da planta, porém aumentam seu nível de expressão quando expostas a algum tipo de estresse (SINGH et al., 2014; JIANG et al., 2015; MILLER; ALVES; SLUYS., 2017).

Dentre as proteínas PR estão a família PR-5, conhecidas por taumatinas e osmotinas. Membros desse grupo de proteínas possuem particular importância e têm sido descritos por exercerem eficaz atividade antifúngica, mediada por alterações na bicamada lipídica do patógeno invasor, ou pela produção de poros transmembrana (VANLOOM et al., 2006; EL-KEREAMY et al., 2011; VIKTOROVA et al., 2012). Também possuem uma carga catiônica e uma quantidade significativa de resíduos hidrofóbicos que são comuns a proteínas antimicrobianas, e ainda inibem a germinação dos esporos de fungos (GUO et al., 2016; LIU et al., 2016; STANGARLIN et al., 2011; VIKTOROVA et al., 2012).

Além de sua atividade antifúngica e antimicrobiana comprovada, estudos demonstram que as proteínas PR-5, especialmente as do tipo Osmotina, atuam na capacidade de tolerância a seca, e já foi comprovado que sua superexpressão em plantas transgênicas proporciona uma maior tolerância ao estresse osmótico (PATADE et al., 2013; WEBER et al., 2014).

Na atualidade, são grandes as preocupações em relação a estabelecer estratégias sustentáveis e eficientes no controle de pragas e doenças nas plantas, visto que estas têm essencial importância em diversos setores como a biotecnologia aplicada a agronomia. Neste sentido, estudos sobre a resistência das plantas aos patógenos vêm ganhando cada vez mais destaque. As grandes perdas na agricultura causadas por fungos torna necessária a busca por novas moléculas antimicrobianas, visando reduzir a quantidade de agrotóxicos usada, os quais são totalmente nocivos ao homem e ao meio ambiente.

A busca por novos genes para superação de doenças ou pragas em plantas por meio do melhoramento genético é uma técnica promissora, uma vez que a caracterização desses novos genes pode ser a solução para diminuir as grandes perdas no setor agrônomo, desenvolvendo cultivares que sejam mais resistentes e ao mesmo tempo sustentáveis.

No Brasil, o Bioma Caatinga é predominante em todos os estados do Nordeste e em uma pequena porção do norte de Minas Gerais. É considerado um dos Biomas mais ricos do país em termos de biodiversidade (IBAMA, 2009). Por ser uma região com variações de temperatura, salinidade, baixos índices pluviométricos, a caatinga é uma valiosa fonte de pesquisas genéticas, principalmente no que diz respeito a estudos de proteínas relacionadas com a defesa, visto que a vegetação é constantemente exposta a estresses bióticos e abióticos característicos dessa região.

O interesse de se isolar genes *PR-5* em plantas da caatinga se justifica pelo fato de que os genes evoluem em resposta as condições ambientais, portanto genes desse tipo de planta apresenta adaptação ao clima Semiárido, disponibilizando uma promissora ferramenta para aplicação em estratégias do melhoramento molecular de plantas resistentes a patógenos e/ou a seca.

Nesse contexto, pesquisas vêm sendo desenvolvidas envolvendo plantas da caatinga e proteínas de defesa do grupo PR-5. Oliveira (2013) testou alguns protocolos para extração de DNA genômico em dez plantas típicas da região Semiárida, Abreu (2016) aponta em seus estudos que é possível encontrar genes que codificam proteínas PR-5 em plantas do semiárido, porém a ausência de depósitos de genes *PR-5* de espécies vegetais da caatinga no GenBank revela necessidade de estudos mais aprofundados de prospecção.

A planta *Amburana cearensis* (Allemão) A. C. Sm, pertencente à família Fabaceae e subfamília Faboideae, é uma planta típica da região Semiárida do nordeste do Brasil, conhecida popularmente como amburana ou umburana de cheiro, cumaru, cerejeira do nordeste, e cumaru do Ceará, muito utilizada na medicina popular principalmente no tratamento de doenças respiratórias e infecções (AGRA et al., 2007). Possui uma grande concentração de cumarina o que aponta um grande potencial antipatogênico (SHAFIQUE; AHMED, 2017).

Apesar de ser uma planta com múltiplas funcionalidades, a *A. cearensis* ainda é geneticamente pouco estudada, o que incrementa a importância de estudos voltados para esta espécie, visando desenvolver técnicas para melhoramento genético de plantas cultivadas através de genes que codificam proteínas do grupo PR-5 semelhantes à osmotina, uma vez que esses genes participam do sistema imune inato das plantas, é possível que no genoma de *A. cearensis* estejam presentes um ou mais genes *PR-5*, visto que esta planta apresenta características de tolerância a estresses bióticos e abióticos, além de ser utilizada como planta medicinal e apresentar propriedades farmacológicas antimicrobianas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Prospectar genes *PR-5* em cumaru (*Amburana cearensis*), por meio de PCR com primers específicos.

2.2 Objetivos Específicos

1. Extrair DNA total de cumaru a partir de folhas jovens, usando o protocolo de extração de CTAB;;
2. Analisar a quantidade e qualidade do DNA extraído, por meio de leitura em espectrofotômetro e eletroforese em gel de agarose;
3. Amplificar DNA de cumaru por meio de reações em cadeia da polimerase (PCR) com diferentes combinações de primers específicos para genes que codifiquem proteínas PR-5. .

2.3 Objetivos Acadêmicos

1. Realizar treinamento em técnicas básicas de biologia molecular.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Proteínas relacionadas com a patogênese

Para superar ataques de fitopatógenos, as plantas desenvolvem mecanismos de defesa capazes de conferir resistência aos seus tecidos, ou seja sua sobrevivência depende da eficácia em gerar rapidamente substâncias com propriedades antifúngicas e antimicrobianas, quando expostas a algum agente patogênico (FISTER et al.,2016). Segundo Laurindo e colaboradores (2018), isso indica que, durante o ataque do patógeno a síntese de proteínas de defesa é prioridade para a planta enquanto que outros processos são reduzidos como a fotossíntese, até o problema ser controlado. A ativação dessas respostas de defesa podem se dá por meio da indução sistêmica pela síntese de fitoalexinas, compostos fenólicos e as proteínas PR (proteínas relacionadas com a patogênese) que entre os fatores relacionados a imunidade, é considerada como uma das repostas inatas mais importantes das plantas contra o ataque de patógenos (CRUZ et al.,2016; EKCHAWING et al.,2017; KAUR; KUMAR; REDDY.,2017).

Quando o vegetal passa por algum tipo de estresse seja ele biótico ou abiótico, receptores são ativados para que haja sinalização do gene que pode resultar em respostas de defesa que restringem a atividade do patógeno (MILLER; ALVES; SLUYS., 2017). As proteínas PR principais responsáveis por essa capacidade da planta, acumulam-se em locais remotos não infectados porém aumentam seu nível de expressão quando expostas a algum tipo de estresse (JIANG et al., 2015; NOGUEIRA et al., 2012).

Na atualidade esse grupo de proteínas é caracterizado em 17 famílias conforme suas propriedades químicas e atividades biológicas abrangendo de PR-1 a PR-17 (Tabela 1) (VAN LOON et al., 2006), apresentando algumas especificidades quanto ao seu modo de ação como por exemplo as do grupo PR-3, PR-4,PR-8 e PR-11 são classificadas como quitinases e a do grupo 2 glucanases agindo na hidrólise de quitina e glucana que são polímeros presentes na parede celular dos fungos, já as proteínas do grupo PR-5, PR-12, PR-13 e PR-14 atuam na membrana plasmática, as PR-7 são endoproteínases e as PR-10 ribonucleases. (STANGARLIN, 2011).

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

	TIPO DO MEMBRO	PROPRIEDADES
PR-1	Tabaco PR-1 ^a	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: Adaptada de Van Loon et al., (2006).

3.2 Proteínas PR-5

As proteínas PR-5 também conhecidas por taumatinas e osmotinas são de notável importância, estão presentes no sistema imune de plantas e animais protegendo-os quando há interação da planta hospedeira com algum agente patogênico como vírus, bactérias, oomicetos e fungos, nematódeos, parasitas como o fitoplasma, insetos e pragas (MILLER; ALVES; SLUYS., 2017; VANLOOM et al., 2006). Plantas e animais usufruem de proteínas intracelulares do domínio de ligação dos nucleotídeos para detectar diversos tipos de agentes patogênicos (JONES; VANCE; DANGL., 2016).

Este grupo de proteínas possui atividade antifúngica e exercem essa função aumentando a permeabilidade da membrana plasmática do patógeno invasor, provocando alterações na bicamada lipídica, produzindo poros transmembrana (EL-KEREAMY et al., 2011; VIKTOROVA et al., 2012) Também foi indicado que algumas dessas proteínas possuem uma carga catiônica e uma quantidade significativa de resíduos hidrofóbicos que são comuns a proteínas antimicrobianas (LIU et al., 2016). Ainda foi demonstrado que a proteína da família PR-5 possui atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo*, como por exemplo, a ação direta inibindo o crescimento do patógeno

ou da germinação dos esporos (GUO et al., 2016; STANGARLIN et al., 2011; VIKTOROVA et al., 2012).

Segundo Vandana e Bhai (2017), as proteínas PR-5 similares a taumatina, atuam na defesa da planta contra oomicetos como *Phytophthora infestans* produzindo substâncias que serão clivados na parede deste fungo invasor. A taumatina inibe o crescimento das hifas e reduz a germinação de esporos provavelmente pela permeabilização da membrana do patógeno e interação com seus receptores, e possui uma significativa capacidade de degradar o polímero 1,3- β -glucano sugerindo uma atividade potencial anti-omicetos (LAURINDO et al., 2018).

Outro gene do grupo de proteínas PR-5 é o do tipo osmotina, proteína que foi encontrada pela primeira vez na epiderme de *Nicotiana tabacum* sob condições de estresse osmótico. É uma proteína catiônica multifuncional que se adequou a ambientes sujeitos a diversos estresses abióticos como temperatura, salinidade, e na tolerância ao estresse osmótico, atuando na membrana plasmática do vegetal quando esta está sob condições de baixo potencial hídrico. Além disso, é uma molécula que possui propriedades antifúngicas atuantes comprovadas, não apenas na defesa contra fitopatógenos, como também contra importantes contaminantes de alimento (VANLOOM et al., 2006; VIKTOROVA et al., 2012; VIKTOROVA et al., 2016).

Recentes estudos em linhagens de pimenta preta (*Piper nigrum*) mostraram que a expressão diferencial do gene PR-5 semelhante a osmotina após a inoculação de um patógeno agressivo da espécie *Phytophthora capsici* tornou a planta mais resistente (VANDANA; BHAI, 2017). Em outro estudo foi demonstrado que a superexpressão de um gene do tipo osmotina isolado de uma erva daninha conhecida como Maria preta (*Solanum nigrum*) confere tolerância a seca em soja transgênica (WEBER et al., 2014). Segundo Kumar (2016), a combinação de um gene PR-5 do tipo semelhante a osmotina com o gene PR-11 do tipo quitinase superexpressos em tomate demonstrou ser uma potencial técnica para melhoramento de culturas desse vegetal.

UFMG/BIBLIOTECA

3.3 Extração de DNA genômico total de plantas do Semiárido

No melhoramento genético de plantas, a busca por métodos de extração eficientes que forneçam DNA íntegro e livre de contaminações e otimização de protocolos de Reações em Cadeia da Polimerase (PCR), são de essencial importância para garantir o sucesso das técnicas moleculares e obtenção de bons resultados. Se um protocolo funcionar para uma variedade de espécies de plantas, economizaria tempo e custo no processo de melhoramento molecular de plantas (SANTOS,2009; PATHIRANA et al., 2018).

Devido à escassez de estudos genômicos em plantas do semiárido, pesquisas estão sendo desenvolvidas para otimização de protocolos de extração de DNA nesse tipo de vegetal. Visando estabelecer o meio mais eficaz para extração, Oliveira (2013), testou três tipos de ajustes no protocolo de extração pelo método de CTAB em dez plantas da caatinga. Arruda e colaboradores (2017), também otimizou este protocolo baseando-se em folhas da espécie *Mimosa tenuiflora*, buscando diminuir a quantidade de contaminações no DNA extraído.

3.4 A planta *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Smith

O cumaru (*Amburana cearensis*), da família Fabaceae e subfamília Faboideae, é uma planta nativa do Brasil típica da região semiárida do Nordeste. Conhecida popularmente por cumaru-de-cheiro, cerejeira do nordeste, amburana de cheiro, e cumaru do Ceará, é muito utilizada como planta medicinal por possuir elevado potencial farmacológico em suas sementes e casca do caule tendo como constituintes a cumarina, que são lactonas do ácido o-hidroxi-cinâmico, com atividade antiinflamatória, anticoagulante, vasodilatadora, espasmolítica, antitrombótica entre outras (LIMA et al.,2013; CANUTO et al.,2012). Possui peptídeos que exercem atividade antifúngica e antimicrobiana, devido a presença de cumarina e flavonoides em sua formação, que possuem esse tipo de propriedade (DOS SANTOS et al., 2010; SÁ et al., 2011; DETSI; KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA., 2017). Além disso, sua madeira é muito utilizada na carpintaria por ser resistente ao ataque de insetos (SANTOS et al., 2007).

A importância de buscar genes *PR-5* do tipo Osmotina que apresentam características de resistência a estresses principalmente abióticos em uma planta

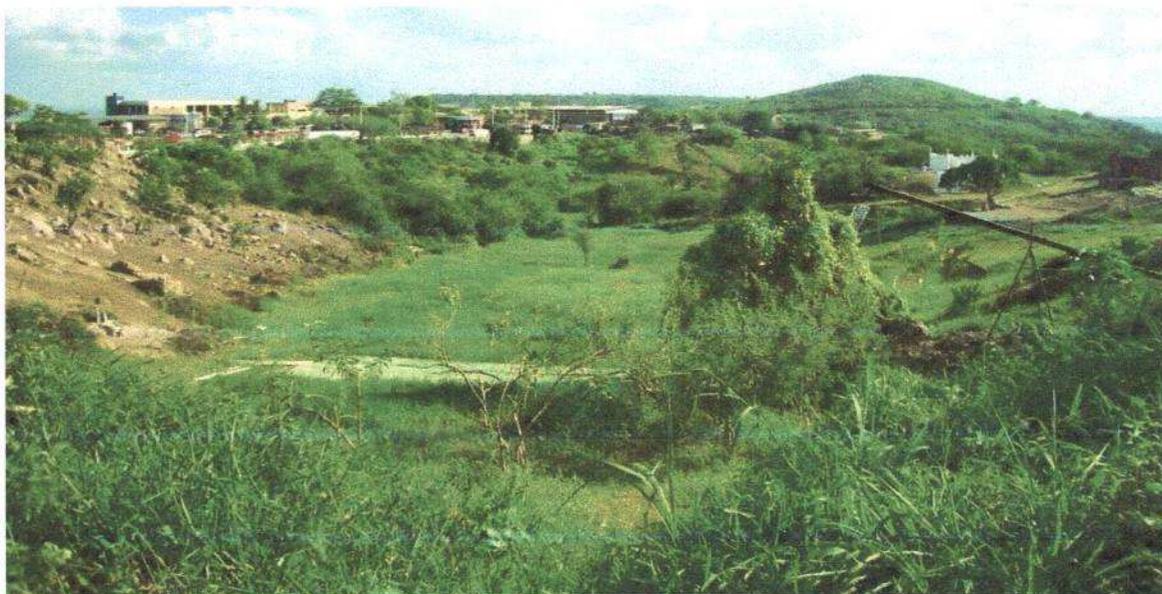
como o cumaru se dá pelo fato de que é uma planta com provável atividade antipatogênica, que está adaptada as condições climáticas instáveis do semiárido nordestino e que possivelmente possui em seu genoma potenciais características para serem utilizadas em melhoramento genético de plantas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta e caracterização da planta com características genômicas importantes no horto florestal do CES

O local da coleta foi o Horto Florestal Olho d'Água da Bica, uma Reserva Florestal de Caatinga que atualmente se encontra aos cuidados da Universidade Federal de Campina Grande *Campus* Cuité. Foram coletadas folhas jovens da planta *Amburana cearensis*, fotografadas e identificadas pelo nome popular e científico através de consulta a bibliografia especializada. As folhas foram embrulhadas em papel alumínio e levadas em cuba de isopor até o Laboratório de Biotecnologia - LBiotec do CES/UFCG, onde ficaram armazenadas no freezer a -20° C até o momento da extração.

Figura 1. Vista parcial do Horto Florestal Olho D'água da Bica, onde foram coletados as folhas da planta *A. cearensis*



Fonte: Google imagens

Figura 2. Planta *Amburana cearensis* (Alleirão) A.C.Sm em período de estiagem.



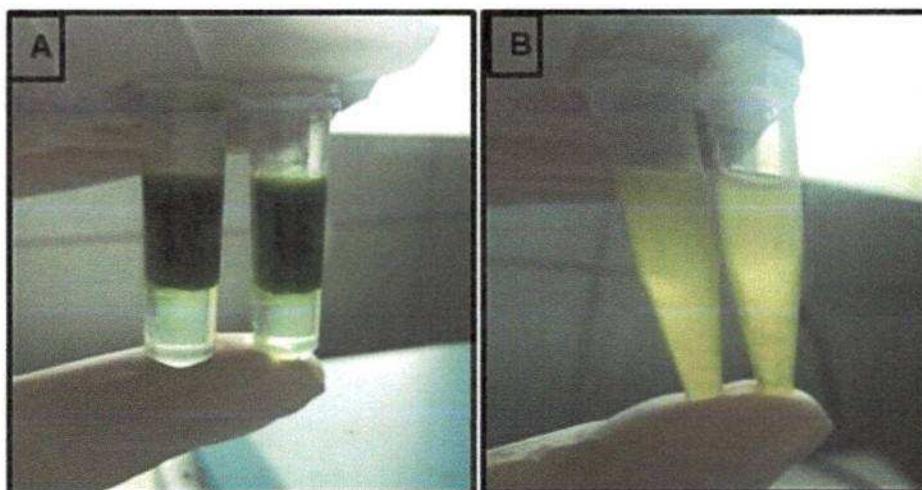
Fonte: Google imagens

4.2 Extração de DNA total de cumaru utilizando protocolo de CTAB

Foram utilizadas 200 mg de tecido vegetal jovem de *A. cearensis* e maceradas utilizando cadinho e pistilo congelados e autoclavados ao qual será adicionado o tampão de extração CTAB (CTAB 2%, NaCl 2 M, Tris-HCl pH 8,0 200 Mm, EDTA pH 8,0 20 mM), onde o CTAB tem função de quebra da parede celular, o NaCl é um tipo de sal que ajuda na precipitação do DNA, o Tris-HCl é um agente tamponante que evita que o DNA seja degradado por enzimas, e o EDTA age tirando os metais presentes na parede celular. Foram recuperados aproximadamente 800 μ L da amostra em microtubos de 2 mL. Na capela de exaustão 5 μ L de β -mercaptoetanol, e logo após foi colocado em banho-maria por aproximadamente 30 minutos a 65°C, voltando para capela de exaustão foi adicionado igual volume de clorofil (clorofórmio álcool-isoamílico 24:1) para separar os ácidos nucleicos das proteínas e misturados por meio de agitação vigorosa por 2 minutos. Ao fim da agitação foi colocado na centrífuga a 12.000 RPM durante 15 minutos o sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo tubo onde se adicionou Isopropanol, duas vezes o volume da fase aquosa para que as fitas de DNA precipitassem. Aconteceu uma nova centrifugação a 12.000 RPM, desta vez com refrigeração por 20 minutos. Logo após foi descartado o Isopropanol e 500 μ L e etanol 75% gelado foi utilizado para lavar o

pellet de DNA. Por último, logo após o processo de secagem a temperatura ambiente, o pellet foi ressuspendido em água Milli-q.

Figura 3- (A) Etapa da extração de DNA onde acontece a separação de ácidos nucleicos das proteínas; (B) Visualização do novelo de DNA da espécie *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm.



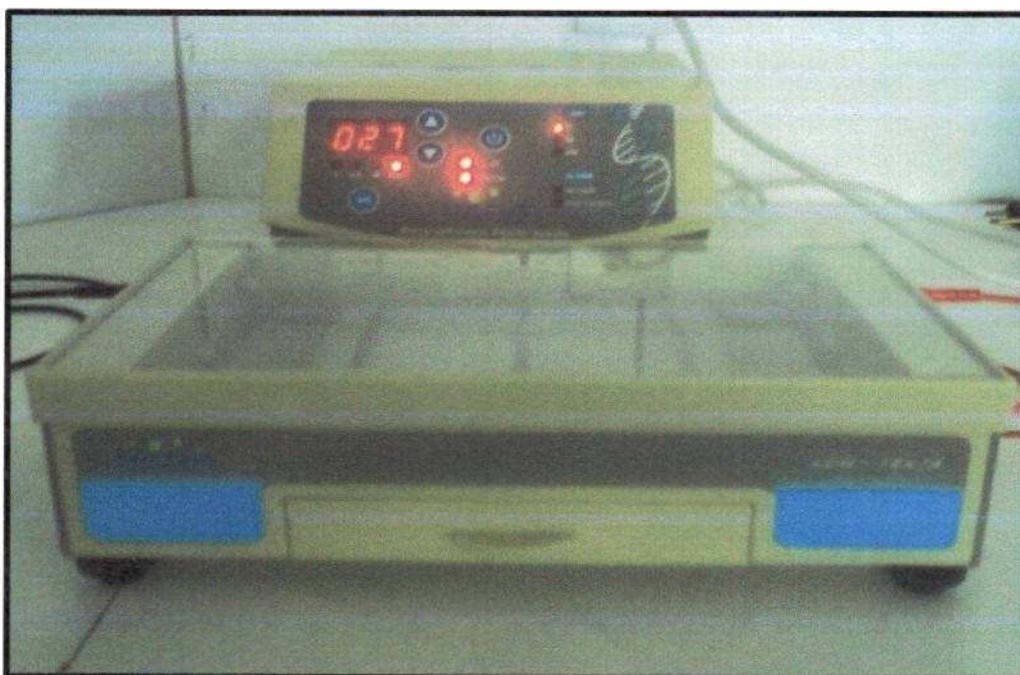
Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

4.3 Eletroforese horizontal utilizando gel de agarose

O gel de agarose foi preparado a 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 a solução é fervida no micro-ondas por 4 minutos. Ao atingir a temperatura considerada ideal (morno) foi acrescentado 5 μ L de Brometo de etídio, misturando cuidadosamente para que não forme bolhas, o gel foi vertido na cama de eletroforese aguardando aproximadamente 30 minutos para solidificação do gel e retirada dos pentes, formando o que chamamos de poços. Depois disso a cama de eletroforese foi encaixada na cuba e as amostras de DNA extraído foram adicionadas, juntamente com 2 μ L de tampão de amostra (Ficoll tipo 400(30%), EDTA PH 8,0 (1Mm), azul de bromofenol (0,25%)) em seguida será adicionado TAE 1x (Tris acetato:EDTA). As condições de corrida para a migração do DNA em gel foram de

100 Volts durante 30 minutos. O gel foi visualizado posteriormente sob luz ultravioleta em um transiluminador e fotodocumentado

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



Fonte: Dados da pesquisa,2018

4.4 Quantificação de DNA em espectrofotômetro

Em razão da quantidade de DNA extraído variar de acordo com a espécie vegetal e o protocolo utilizado, foi realizada a quantificação do DNA da amostra por espectrofotometria, com concentração medida por leitura em densidade ótica, no comprimento de ondas ultravioleta. A amostra de DNA extraída foi submetida 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 2000 (Thermo Scientific), utilizando uma pequena alíquota do produto de extração, somente 1 μ L da amostra.

4.5 Reações em Cadeia da Polimerase (PCR)

Reações em Cadeia da Polimerase foram feitas a partir de seis combinações de primers específicos para genes *PR-5* descritos no quadro 1. As sequencias dos primers utilizados estão indicadas na tabela 2, sendo o primer PPS1 descrito por CAMPOS, et al, (2002). A PCR consistiu no preparo de um Master mix para 10 reações de 20 μ L, utilizando 1 X de Tampão PCR Buffer minus Mg (Invitrogen), 1,5 mM de $MgCl_2$ (Invitrogen), 0,2 Mm de dNTPs, 0,5 mM de Primer senso (Foward), 0,5 Mm de Primer antisenso (Reverse), 1 U da enzima Taq DNA Polimerase Recombinante (Invitrogen), e 100 ng de DNA (Este foi colocado diretamente no microtubo). No termociclador três fases fundamentais devem ocorrer durante a realização dos ciclos da PCR, e cada uma dessas fases necessita de diferentes temperaturas determinadas de acordo com o tipo de DNA e Primer que está sendo trabalhado. Diante disso as reações térmicas foram realizadas da seguinte maneira : 1 ciclo de desnaturação inicial a 95° por um minuto, 35 ciclos de desnaturação (95° por 45 segundos) anelamento (50° por 30 segundos), e extensão (72° por 5 minutos). O diagnóstico da PCR foi realizado por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, observados sob luz ultravioleta e fotodocumentados, conforme descrito no item 4.3, utilizando 15 μ L de cada reação.

Quadro 1: Combinações de Primers utilizados na PCR

PRIMER SENSO (FOWARD)	PRIMER ANTISENSO (REVERSE)
PPS1	PCTP2
PPS2	PCTP2
PPS2	PCTP3
PPS3	PCTP2
PPS3	PCTP3
NP1	PCTP2

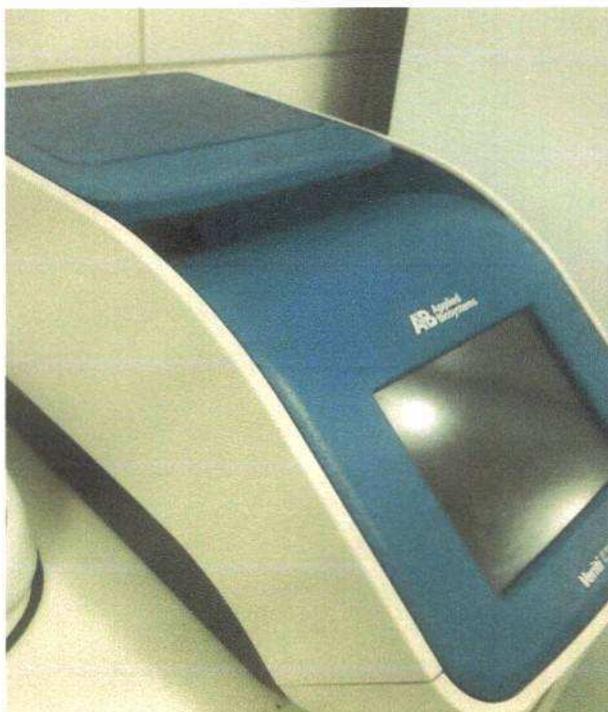
Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 2: Sequências dos Primers utilizados na PCR

Primer	Direção	Sequência de nucleotídeos (5' -3')
PPS1	Senso (Foward)	CGCGGATCCATGGGCTACTTGAGATCT
PPS2	Senso (Foward)	CGCGGATCCATGGCTCGCTTCACTATCC
PCTP2	Antisenso (Reverse)	CCCAAGCTTAATGCACAGGTGTTGTCC
PCTP3	Antisenso (Reverse)	CCAAAGCTTAATGHWCAKKTGTTGTCC
NP1	Senso (Foward)	(Campos et al., 2002)

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5: Termociclador (Applied Biosystems) onde foram realizadas as reações em cadeia da polimerase.



Fonte: Dados da pesquisa

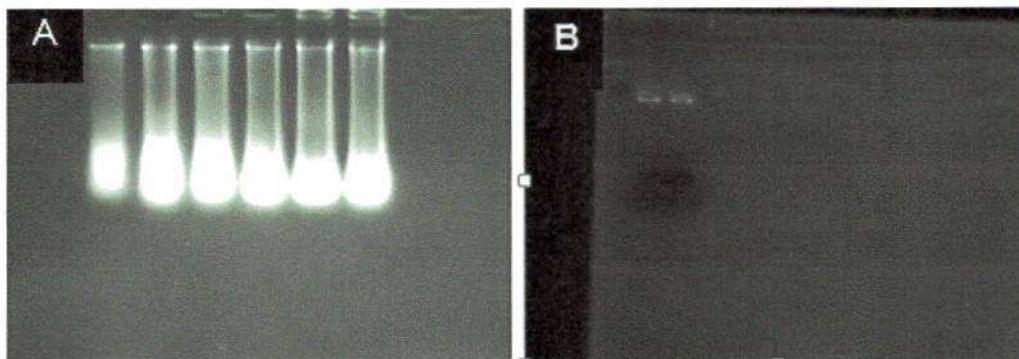
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise da integridade do DNA genômico de *A. cearensis* por meio de eletroforese horizontal em gel de agarose

O protocolo de CTAB foi eficiente para extrair o DNA genômico da planta *A. cearensis* duas extrações realizadas (Figuras 3, Tabela 3). A extração é um momento extremamente importante para análises de organização e estrutura do genoma de plantas, para o isolamento de genes por PCR e caracterização molecular. Um DNA de qualidade, armazenado de forma adequada e devidamente quantificado é fundamental para se obter sucesso em qualquer técnica molecular. Contudo, esta etapa apresenta dificuldades devido a grande quantidade de polissacarídeos e fenóis presentes na espécie. A coleta de material vegetal bastante jovem e armazenamento em freezer -20°C agilizou o processo de maceração, mostrando a eficiência dessa tática para maximização do rendimento de DNA, uma vez que o LBIotec não dispõe de Nitrogênio Líquido, o que facilitaria a preservação do material genético íntegro.

O diagnóstico de qualidade do DNA extraído por meio do protocolo utilizado foi feito através de eletroforese horizontal utilizando gel de agarose à 0,8% (Figura 6). A partir desse procedimento foi possível observar concentração, qualidade e degradação do material genético extraído. As amostras de repetições das extrações apresentaram fluorescência nítida para duas bandas, sendo que a superior indica a presença de DNA íntegro, apesar de um arraste indicar um pouco de degradação, enquanto que a banda inferior revela uma quantidade significativa de RNA, o que pode ser explicado por não ter sido utilizada a enzima RNase para retirada do RNA.

Figura 6- Eletroforese em gel de agarose 1% de amostras de DNA de *A. cearensis* extraído pelo método de CTAB. (A) Primeira extração (B) Segunda extração.



Fonte: Dados da pesquisa

5.2 Análise da quantidade e pureza do DNA por Espectrofotometria

Uma vez que os DNAs presentes nas amostras apresentaram perfil eletroforético similar, foi realizado um mix das amostras/extração. As amostras apresentaram uma média de concentração de DNA superior a 100 ng/μL com índice 260/280 igual ou superior a 1,8 para as duas amostras o que indica um valor esperado (Tabela 3).

Tabela 3: Medições espectrofotométricas do mix de amostras de DNA de *A. cearensis* extraídas por CTAB, por meio de espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo scientific).

Amostras de DNA	Concentração de ácidos nucleicos ng/ μL	A260/280
Mix de amostras da extração 1	1353,7	1.92
Mix de amostras da extração 2	894,1	1.81

Fonte: dados da pesquisa

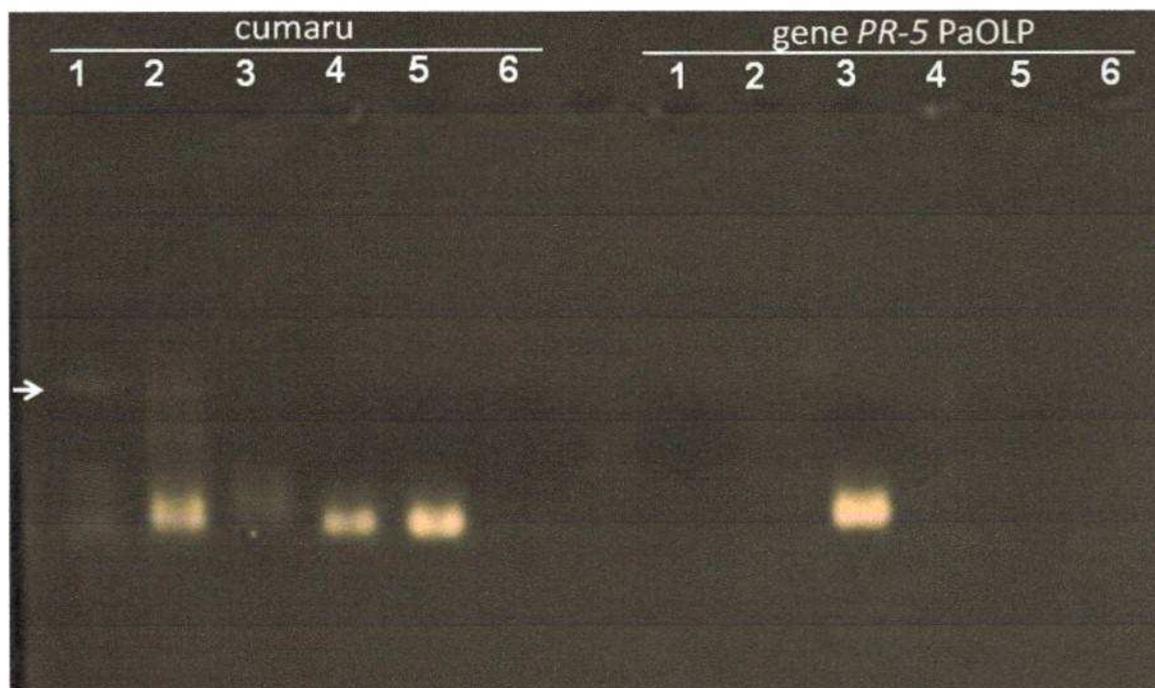
A partir dos dados da Tabela 3 podemos notar que a quantidade de ácidos nucleicos presentes é superior a que se apresentou na eletroforese. Isso pode ser

justificado pelo fato de que o espectrofotômetro quantifica DNA íntegro e degradado e ainda as contaminações por RNA. A extração número 1 apresentou grau de pureza próximo ao ideal e foi escolhido portanto para a realização da PCR. Segundo Mazza e Bittencourt (2000) um DNA puro deve estar com um valor de absorbância entre 1,8 e 2,0.

5.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Dentre as seis combinações de primers específicos para genes PR-5 que foram testadas, duas delas amplificaram fragmentos de tamanho esperado (~700 pb) para genes PR-5 completos a partir do DNA genômico de *A. cearensis*, que foram PPS1/PCTP2 e a PPS2/PCTP2 (Figura 7).

Figura 7: Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos de PCR utilizando o DNA extraído de *A. cearensis* com as seguintes combinações de primers: PPS1/PCTP2 (1); PPS2/PCTP2 (2); PPS2/PCTP3 (3); PPS3/PCTP2 (4) PPS3/PCTP3 (5); NP1/PCTP2 (6). Controle negativo (7) para água e primers; Controle positivo utilizando o gene PR-5 PaOLP, isolado de *Physalis angulata* (1-6). A seta indica o tamanho aproximado de 700 pb.



Fonte: Dados da pesquisa

O primer PPS1 utilizado foi desenhado para anelamento em putativos genes PR-5 com homólogos a genes de plantas da família Solanaceae, descrito por Campos

et al. (2002), com o qual foi isolado os genes *PR-5 SnOLP*, isolado da erva daninha *Solanum nigrum* e o gene *PaOLP* isolado de *Physalis angulata*, planta presente no Horto Florestal do CES/UFCG. Além deste, também foram utilizados outros primers específicos para genes *PR-5* disponíveis no LBiotec. Os genes *PR-5* consistem em genes de defesa contra patógenos, como foi citado em pesquisa realizada com cana de açúcar por Saciloto (2003).

Uma vez que os primers utilizados são esperados para amplificação de genes *PR-5*, este resultado demonstra que o DNA extraído de *A. cearensis* foi amplificável por PCR e que, putativamente, a presença de genes *PR-5* no genoma dessa planta. A presença de genes *PR-5* é esperada em todas as plantas, visto que esses genes fazem parte do sistema imune inato das plantas.

Abreu (2016) obteve sucesso na amplificação de fragmentos gênicos de fruteiras nativas do Semiárido utilizando primers específicos para genes que codificam esse grupo de proteínas PR, demonstrando que esta característica genômica tão importante está presente em plantas dessa região. O isolamento completo desses genes proporcionará estudos de funcionalidade, como os obtidos por Kumar (2016) que mostraram a obtenção de tolerância a estresses bióticos e abióticos após a superexpressão de um gene do tipo *PR-5* em tomateiro.

O sequenciamento de amplicons comprovaria os resultados observados no gel de agarose. Comprovar a presença desse gene que confere tolerância a diversos tipos de estresse, em plantas de uma região que sofre com variações de temperatura, salinidade e escassez de chuvas é importantíssimo para se desenvolver técnicas para adaptação de plantas cultiváveis de vivam sob estas mesmas condições.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nesta pesquisa foi possível concluir que:

- O protocolo de CTAB utilizado é eficiente para a extração de DNA cumaru;
- O DNA de cumaru extraído é amplificável por PCR, gerando fragmentos de tamanhos esperados para genes *PR-5*;
- Os amplicons de tamanhos esperados para genes completos do tipo *PR-5* necessitam ser purificados e sequenciados, visando comprovar a presença dos mesmos, e é a continuidade deste trabalho.

7. REFERÊNCIAS

ABREU, R. A. Caracterização Funcional e Estrutural Comparativa *in silico* de uma proteína PR-5 do Tipo Taumatina de *Poncirus Trifoliata*. Monografia de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Campina Grande, Cuité PB. 2015. p 55.

AGRA, M. F. et al. SINOPSE DA FLORA MEDICINAL DO CARIRI PARAIBANO. **Oecol.bras**, v.11, n.3, p.323-330, 2007.

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.

CANUTO, K. M. et al. Phytochemistry, pharmacology and agronomy of medicinal plants: *Amburana cearensis*, an interdisciplinary study. In: **Phytochemicals-A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health**. InTech, 2012.

DA CRUZ, M.P. et al. POTENCIAL DE INDUTORES DE RESISTÊNCIA NO TRATAMENTO DE SEMENTES DE ANGICO-BRANCO (*ANADENANTHERA COLUBRINA* (VELLOZO) BRENAN) E NO CONTROLE DE *FUSARIUM* SP. EM CONDIÇÕES IN VITRO. **Salão do Conhecimento**, v. 2, n. 2, 2016.

DETSI, A.; KONTOGIORGIS, C.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Coumarin derivatives: an updated patent review (2015-2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, p. 1-26, 2017.

DOS SANTOS, P.H. et al. Partial characterization and antimicrobial activity of peptides from *Amburana cearensis* seeds against phytopathogenic fungi and yeasts. **Acta physiologiae plantarum**, v. 32, n. 3, p. 597-603, 2010.

EKCHAWENG, K. et al. The plant defense and pathogen counterdefense mediated by *Hevea brasiliensis* serine protease *HbSPA* and *Phytophthora palmivora* extracellular protease inhibitor *PpEPI10*. In: **Plos One**, v. 12, n. 5, p. e0175795, 2017.

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.

FISTER, A. S. et al. Theobroma cacao L. pathogenesis-related gene tandem array members show diverse expression dynamics in response to pathogen colonization. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 363, 2016.

GUO, J. et al. Expression of the LePR5 gene from cherry tomato fruit induced by *Cryptococcus laurentii* and the analysis of LePR5 protein antifungal activity. **Postharvest Biology and Technology**, v. 111, p. 337-344, 2016.

JIANG, L. et al. Isolation and characterization of a novel pathogenesis-related protein gene (GmPRP) with induced expression in soybean (*Glycine max*) during infection with *Phytophthora sojae*. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. e0129932, 2015.

JONES, J.D.J.; VANCE, R.E.; DANGL J.L. Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. In: **Science**, v. 35, n. 4, p. aaf6395, 2016.

KAUR, A.; KUMAR, A.; REDDY, M.S. Plant–Pathogen Interactions: A Proteomic Approach. In: **Understanding Host-Microbiome Interactions-An Omics Approach**. Springer, Singapore, p. 207-225. 2017.

KUMAR, S.A et al. Beyond just being foot soldiers – osmotin like protein (OLP) and chitinase (Chi11) genes act as sentinels to confront salt, drought, and fungal stress tolerance in tomato. In: **Environmental and Experimental Botany**, v.132, p. 53-65. 2016.

LAURINDO, B.S et al. Comparative Proteomics Reveals Set of Oxidative Stress and Thaumatin-Like Proteins Associated with Resistance to Late Blight of Tomato. In: **American Journal of Plant Sciences**, v. 9, p. 789-816, 2018

LIMA, L.R et al. Avaliação da atividade antiedematogênica, antimicrobiana e mutagênica das sementes de *Amburana cearensis* (A. C. Smith) (Imburana-de-cheiro). In: **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v.15, n.3 p. 415-422, 2013.

LINCOLN, J.E et al. Plant and animal PR1 family members inhibit programmed cell death and suppress bacterial pathogens in plant tissues. In: **Molecular plant pathology**, artigo aceito, doi: 10.1111/mpp.12685, 2018.

LIU, C. et al. Structure–function relationship of a novel PR-5 protein with antimicrobial activity from soy hulls. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 4, p. 948-959, 2016.

MAZZA, M. C. M.; BITTENCOURT, J. V. M. 2000. **Extração de DNA de tecido vegetal de Araucaria angustifolia (Araucariaceae)**. Boletim de Pesquisas Florestais Colombo, 41: 12-17.

MONITORAMENTO DA CAATINGA. Disponível em <http://siscom.ibama.gov.br/monitora_biomass/PMDBBS%20%20CAATINGA.html> acesso em 26 de junho de 2018

MILLER, R.N.G.; COSTA ALVES, G.S.; VAN SLUYS, M. Plant immunity: unravelling the complexity of plant responses to biotic stresses. **Annals of botany**, v. 119, n. 5, p. 681-687, 2017.

OLIVEIRA, E.S. Estabelecimento de protocolos para microextração de Dna de plantas do semiárido. Monografia de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Campina Grande, Cuité PB. 2013.

PATADE, V.Y et al. Cold tolerance in Osmotin transgenic tomato (*Solanum* responsive genes. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 117, 2013.

SÁ, M.C.A et al. Antimicrobial activity of caatinga biome ethanolic plant extracts against gram negative and positive bacteria. In: **Revista brasileira de Ciências Veterinárias**, v.18, n.2/3, p. 62-66, 2011.

SÁ, M. B et al. Phytochemistry and preliminary assessment of the antibacterial activity of chloroform extract of *Amburana cearensis* (Allemão) AC Sm. against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing strains. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

SACIOTO, R. F. Z. Inserção do gene *PR-5k* em cana de açúcar visando induzir a resistência ao fungo da ferrugem *Puccinia melanocephala*. **(Dissertação) – Mestrado**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo- USP. Piracicaba, 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.

SANTOS, A.M.A et al. Reflexões sobre os efeitos das Mudanças Climáticas na Biodiversidade da Caatinga. In: **Diversitas Journal**, v.1, n.1, p. 113-118, 2016.

SHAFIQUE, S.; AHMAD S.S.A. Biochemical and Molecular Screening of Varieties of Chili Plants that are Resistant against *Fusarium* Wilt Infection. In: **European Journal of Microbiology and Immunology**, v.8, n.1, p.12-19,2018.

SINGH, R. et al. Role of Pathogen related protein families in defence mechanism with potential role in applied biotechnology. **International Journal of Advanced Research**, v. 2, n. 8, p. 210-226, 2014.

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

VAN LOON, L.C.; REP, Ma.; PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 44, p. 135-162, 2006.

VANDANA, V. V.; BHAI, R. Suseela. Differential expression of PR genes in response to *Phytophthora capsici* inoculation in resistant and susceptible black pepper (*Piper nigrum* L.) lines. **European Journal of Plant Pathology**, p. 1-12, 2017.

VIKTOROVA, J. et al. Osmotin, a pathogenesis-related protein. **Current Protein and Peptide Science**, v. 13, n. 7, p. 672-681, 2012.

VICTOROVA, J. et al. New findings in potential applications of tobacco osmotin. In: **Protein Expression and Purification**, v.129, p.84-93, 2016.

WEBER, R.L.M et al. Expression of an osmotin-like protein from *Solanum nigrum* confers drought tolerance in transgenic soybean. In: **BMC Plant Biology**, v.14, n.343, p.2-9, 2014.