

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

MORGANA ISADORA GOMES ABREU

**PROSPECÇÃO DE GENES *PR-5* EM FRUTEIRAS NATIVAS OU ADAPTADAS
AO SEMIÁRIDO PARAIBANO**

CUITÉ-PB

2016

MORGANA ISADORA GOMES ABREU

**PROSPECÇÃO DE GENES *PR-5* EM FRUTEIRAS NATIVAS OU ADAPTADAS
AO SEMIÁRIDO PARAIBANO**

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 a obtenção do Grau de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Magnólia de Araújo Campos

CUITÉ-PB

2016

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

A162p Abreu, Morgana Isadora Gomes.

Prospecção de genes PR – 5 em fruteiras nativas ou adaptadas no semiárido paraibano. / Morgana Isadora Gomes Abreu. – Cuité: CES, 2016.

53 fl.

Monografia (Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2016.

Orientadora: Magnólia de Araújo Campos.

1. Bioinformática. 2. Taumatina. 3. Proteínas de defesa. I. Título.

Biblioteca do CES - UFCG

CDU 57:681.3

MORGANA ISADORA GOMES ABREU

**ISOLAMENTO DE GENES PR-5 DE FRUTEIRAS NATIVAS OU ADAPTADAS
AO SEMIÁRIDO PARAIBANO**

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.

Aprovada em ___/___/___.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra Magnólia de Araújo Campos (Orientadora)

Profº. Dr. Luiz Sodré Neto

Profº. Dr. Marcus José Conceição Lopes

CUITÉ/PB

2016

*Aos meus pais, Inacilda de Fátima e Manoel Jurandir por todo o amor e
investimento em minha formação.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por esta sempre presente em minha vida e guiar-me sempre no caminho certo.

A Universidade Federal de Campina Grande (Campus-CES) por permitir a realização desse curso.

A minha Orientadora Prof Magnólia de Araújo Campos, por aceitar me orientar, pelas contribuições ao meu crescimento acadêmica e paciência em todos os momentos de dificuldade encontrados, obrigada Mag, por me acolher não só como uma orientadora mais como uma grande amiga, tenha certeza que aprendi e irei continuar aprendendo muito com a senhora. Muito obrigada.

Aos meus professores do Centro de Educação e Saúde que contribuíram para minha formação e crescimento acadêmico.

A minha eterna e amada turma, pelas alegrias, brigas e chatices compartilhadas durante todos esses anos.

Ao meu grande amigo de P1 Rayran Araújo, por sempre está presente em meu dia a dia com seu “humor negro” que sempre me alegra, obrigado por cada risada, por cada abraço por cada carão, meu eterno “Mô do meu rango”, nego você não sabe o quanto és e foste importante nessa caminhada. Obrigada pelo apoio em todos os momentos.

Ao meu quarteto que é mais que fantástico, Sabrina Kayne (Bina), Joseph Neves (Jofs), Thatiany Mauricio (Thaty) e Géssica Tavares (Gess), a vocês que sempre estiveram ao meu lado no início disso tudo, em cada momento fosse ele de alegria ou tristeza, sempre me dando apoio e incentivo, obrigada por cada risada compartilhada, por cada lagrima enxugada, por cada momento único que me proporcionaram; as noites de estudo não seriam as mesmas sem vocês. Sem vocês não teria sido divertido e único como foi, amo cada um do seu jeito, obrigada pelas idiotices partilhadas, pelas enrascadas, pelas cachaças tomadas, pelos momentos de cuidado. Que essa amizade dure além da graduação que cada um de vocês realize aquilo que deseja, que sejamos amigos além da vida. Somos o exemplo do que todo professor de ensino médio passa na hora de passar trabalho em grupo, quando ele diz façam grupo de 4, sempre vai ter aquele que vai dizer, “mas professor pode ser de 5?!”, sempre unidos em tudo. A vocês meu muito obrigada. Amo vocês

As amigas que o LBIotec me deu Graciete Balbino, Thamara Azevedo e Fernanda, pelos momentos de risadas compartilhados no laboratório e pelos conhecimentos partilhados, em especial a Fernanda por aceitar me co-orientar e a Graci que sempre teve paciência comigo, obrigada meninas

As amigas de infância Karol, Kely, Renata e Cris, por entenderem a minha ausência durante esses anos, sei que sempre estarão ao meu lado.

A todos os amigos que Cuité me deu durante esses anos, vocês contribuíram para o meu crescimento e formação, obrigado negada.

A Dhyego Barbosa, um “idiota” que caiu em minha vida, sempre me incentivando e acreditando em mim, (valeu boy).

Aos amores que passaram por minha vida nesta etapa, obrigado pelo incentivo, carinho e amizade.

A minha prima e irmã Rayane Abreu, minha Ray, obrigada por me aturar; e “por nada”, já que eu te aturo também (kkk), te agradeço pelos momentos que esteve comigo, momentos esses que não foram poucos, por enxugar minhas lágrimas de tristeza, agonia e raiva, por sorrir e ser idiota junto comigo, por fazer parte da minha vida, obrigada por cada ensinamento e por toda a paciência que tens comigo, pois sei que não é tão fácil assim conviver comigo (apesar que sou uma pessoa bem amável tá), com você aprendi a ser mais doce e meiga, pois és o poço da doçura e meiguice, sempre com um sorriso no rosto, mesmo nos momentos mais difíceis, obrigada por cada incentivo, por cada “vai dá certo” mesmo vendo que não iria da, amiga parceira de todas as horas e momentos, dos mais difíceis aos mais fáceis. Obrigada por me aturar todos os dias, há, sei que faço seus dias mais felizes também tá.

A minha cunhada Cibele Abreu e minhas sobrinhas Helena e Larissa, por todo o incentivo, cuidado e carinho, amo vocês.

A toda minha família, por acreditar no meu sonho e sempre me apoiar em todas as minhas decisões.

Aos tios e padrinhos Josinaldo e Rejane, por me ajudarem no início de toda essa caminhada.

Aos meus avós Carlinda, Auxiliadora e Inácio, por serem exemplo de luta e sabedoria, por todo o carinho, obrigada.

Em especial ao meu avô Manoel Paulino (*in momoriam*), pois mesmo antes de crescer ele já sabia que me tornaria uma Doutora, vô ainda não sou doutora mais já

consegui subir o primeiro degrau, obrigado por desde pequena me incentivar a buscar o conhecimento.

Aos meus irmãos Jonielson, Jonailson e Jairo, por sempre me incentivarem e estarem ao meu lado em cada decisão tomada, por todo o cuidado e carinho, por todos conselhos dados, por toda ajuda durante esse período de minha vida, por tudo, muito obrigada, amo vocês.

Em especial ao meu irmão Jonailson (Ná), por esta ao meu lado em todos os momentos difíceis, por me alegrar nos momentos de tristeza, e por me incentivar a não desistir nos momentos de fraqueza, Ná muito obrigada por levantar de madrugada sempre com um sorriso no rosto pra me levar para pegar o ônibus pra vir pra Cuité, muito abrigada por sempre me esperar quando estava indo de viagem pra casa, obrigada por ser esse menino-homem bobo que sempre me alegra e me coloca pra cima, obrigada por cada oração que fizeste e faz por mim, obrigada por ser meu melhor amigo e companheiro. Se Deus me permitisse mesmo antes de nascer escolher um irmão tenha certeza que eu escolheria você, te amo.

Por fim por serem os mais importantes, aos meus pais Jurandir e Inacilda, por nunca desistirem do meu sonho, até mesmo quando eu pensei em desistir, por sempre estarem ao meu lado, por todo cuidado, amor e carinho, pelo investimento; agradeço por todos os ensinamentos, puxões de orelha, pelos sábios conselhos, por estarem sempre presentes e por entenderem a minha ausência durante essa etapa de minha vida. Painho obrigado por ser esse ser humano iluminado e guerreiro que o senhor é, Mainha obrigada por todas as suas orações e por ser esse exemplo de mulher determinada e guerreira. Vocês são o meu exemplo de vida, tudo isso só tem importância porque vocês estão ao meu lado. É tudo para vocês e por vocês. Amo vocês mais que tudo.

E a todos que contribuíram de alguma forma para o meu crescimento.

Muito Obrigada!

“Escrevo aqui no presente para que no futuro seus olhos possam lembrar de mim, quando sua mente me esquecer” (Bob Marley).

“O único destino escrito, está no DNA, isso chama-se genética, o resto você pode mudar tudo” (Cello Vieira).

*“Voe livre;
Volte firme”.*

RESUMO

Genes *PR-5* possuem importância para aplicações biotecnológicas por apresentar relevantes atividades antifúngica/antioomicetal e de resistência à seca. Estudos genômicos em plantas do Semiárido são escassos, incluindo espécies fruteiras de interesse comercial, embora genes dessas plantas possam estar evolucionariamente adaptados a região. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi prospectar genes *PR-5* em plantas fruteiras presentes no Semiárido Paraibano. A prospecção foi realizada em dois níveis, *in silico* e *in planta*, usando bancos de dados públicos genômicos e etapas iniciais do isolamento de genes *PR-5* presentes nos genomas de espécies vegetais fruteiras do Semiárido Paraibano, respectivamente. A prospecção *in silico* levou a descoberta de que não existem depósitos de sequências no GenBank/NCBI com os nomes “PR-5”, “thaumatin”, “osmotin” e “pathogenesis-related” *versus* nomes de 06 famílias botânicas ou nomes científicos para 08 fruteiras do semiárido, enquanto que no plantGDB existe apenas uma das famílias pesquisadas, Caricaceae, referente ao genoma funcional da fruteira mamão (*Carica papaya*) cultivar “SunUP” transgênica, resistente a vírus. As sequências *PR-5* encontradas no referido genoma foram localizadas por palavras-chave “thaumatin” ou “osmotin” e, em sua maioria, estão incompletas ou com qualidade inferior, sendo incapaz de identificar genes completos, exceto para um gene que foi denominado de *CpTLP*. Este gene codifica uma proteína do tipo taumatina potencialmente ácida, compartilhando características e elevada similaridade de sequência de aminoácidos com outras proteínas *PR-5* disponíveis no banco de dados GenBank. Um modelo construído para a *CpTLP* madura foi significativamente satisfatório e aparentemente funcional, apresentando 8 pontes dissulfeto, formadas por 16 cisteínas conservadas na família *PR-5*, e sítio ativo visivelmente característico. A prospecção *in planta* levou a obtenção de DNAs de 4 espécies fruteiras com qualidade e quantidade suficientes para amplificação por PCR de fragmentos gênicos específicos esperados para genes *PR-5*.

Palavras-chave: Taumatina. Bioinformática. *Carica papaya*. Modelagem molecular.

Proteínas de defesa.

ABSTRACT

PR-5 genes are important for biotechnological applications to present relevant antifungal/antioomycetal and drought resistance activities. Genomic studies from Semiarid plants are rare, including economically interesting fruit species, although these plants have genes that are evolutionarily adapted to the region. In this context, the objective was to prospect *PR-5* genes in fruit plants present in the Paraiba Semiarid. The prospecting was carried out on two levels, *in silico* and *in planta*, by using public genomic databank and initial steps of the isolation of *PR-5* genes from Paraiba Semiarid fruit plant genomes, respectively. Prospecting *in silico* led to the discovery that there are no sequence deposited in GenBank/NCBI named "PR-5", "thaumatin", "osmotin" and "pathogenesis-related" *versus* names for 06 plant families or plant scientific names for 08 Semiarid fruit plant, while in plantGDB there is only one of the surveyed family Caricaceae, referring to the functional genome of transgenic papaya fruit tree (*Carica papaya*) cultivar "SunUP" resistant to virus. The *PR-5* sequences found in that genome were found by keywords "thaumatin" or "osmotin" and, in most cases, are incomplete or inferior quality, being unable to identify complete genes, an exception for a gene that was named *CpTLP*. This gene encodes a potentially acidic protein thaumatin-like protein, sharing characteristics and high amino acid sequence similarities with other *PR-5* proteins from GenBank database. A model built for mature *CpTLP* was significantly satisfactory and apparently functional, presenting 8 disulfide bonds formed by 16 conserved cysteines in the *PR-5* family, and visibly characteristic active site. Prospecting *in planta* lead to obtaining of DNAs from 4 fruit species presenting sufficient quality and quantity for PCR amplification of specific gene fragments expected to *PR-5* genes.

Keywords: Thaumatin. Bioinformatic. *Carica papaya*. Molecular modelling. Defense proteins.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Vista parcial do Horto Florestal Olho D'Água da Bica, Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, município de Cuité PB..... 29
- Figura 2 – Ilustração das espécies vegetais fruteiras in situ cujo DNA foi extraído. **(A)** umbuzeiro (*Spondias tuberosa*); **(B)** romãneria (*Punica granatum*); **(C)** cajueiro (*Anacardium occidentale*); **(D)** goiabeira (*Psidium guajava*); **(E)** pinha (*Annona squamosa*); **(F)** aceroleira (*Maplpighia glabra*); **(G)** seriguela (*Spondias purpurea*).... 30
- Figura 3 – Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos predita da CpTLP, indicando em os códons de início (atg, azul) e término (tga, róseo) da tradução e sublinhados estão os 25 aminoácidos N-terminal de possível peptídeo sinal da proteína..... 36
- Figura 4 – Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos de CpTLP com as proteínas similares, gerado pelo Servidor ClustalW. TcOSM34 (*Theobroma cacao* osmotin 34, acesso n° XP_007040164.1); GrTLP (*Gossypium raimondii* thaumatin-like protein, acesso n° XP_012471838.1); RcTLP, (*Ricinus communis* thaumatin-like protein, acesso n° XP_002509750.1); JcPRPR (*Jatropha curcas* pathogenesis-related protein, acesso n° XP_012086965.1); PtP21 (*Populus trichocarpa* P21 family protein, acesso n° XP_006368746.1); BnBNA (*Brassica napus*, BnaA acesso n° CDY41250.1). 37
- Figura 5 – Modelo molecular tridimensional da CpTLP. **(A)** Representação em faixas (Ribbon) obtidas pelo Programa VMD do modelo 3D proposto para CpTLP, indicando em vermelho a presença das 8 pontes de sulfeto preditas formadas pelos 16 resíduos de cisteína visualizados na Figura 4. **(B)** Sobreposição estrutural entre o modelo teórico para CpTLP (em verde) e o molde PDB 4L2J (em roxo)..... 38
- Figura 6 – Comparação de pontuações de QMEAN obtidas para o modelo de CpTLP (em vermelho) com as pontuações de estruturas de mesmo tamanho (preto/cinza) depositadas no PDB..... 39
- Figura 7 – Imagem representativa da estrutura 3D de CpTLP, indicando o provável sítio de ligação (em vermelho) de acordo com o Cluster1 previsto pelo programa Ghecon.. 40
- Figura 8 – Resíduos que fazem parte da cavidade do sítio ativo de CpTLP com potencial para ligações (em vermelho), de acordo com a análise de Ghecon..... 41
- Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% de DNAs de plantas fruteiras presentes no Horto Florestal Olho d'Água da Bica/CES/UFCG. 1-6. Goiabeira; 7-12. Pinha; 13. Romãzeira; 14. Umbuzeiro; 15 17. Cajueiro; 18-20, Mamoeiro; 21-23. Aceroleira; 24-29, Pinha; 30-32. Umbuzeiro; 33-35. Romãzeira..... 42
- Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% de DNAs genômicos de fruteiras digeridos com ribonuclease A. 1. pinha; 2. umbuzeiro; 3. aceroleira; 4. cajueiro; 5. romãzeira; 6. mamoeiro; 7-8. Goiabeira..... 43
- Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% de produtos da PCR utilizando combinações de primers PCTP1/PPS1(1-9) e PCTP2/PPS2(10-18). M.marcador 1-

10.pinha; 2-11.goiaba; 3-12.romã; 4-13.cajú; 5 14.umbu; 6-15.mamão; 7-16.acerola; 8-17.DNA de M^a pretinha(controle positivo); 9-18.água(controle negativo)..... 45

Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% de produtos da PCR teste para diferentes combinações de primers. **(A)** PPS1/PPM2 (1-4), PPS1/PPM4 (5-8), PPS1/PPM6 (9-13). **(B)** PPS1/PCTP1 (1-4), PPS1/PCTP2 (5-8), PPS1/PCTP3 (9-13) M. marcador, 1. DNA de Maria pretinha (controle positivo), 2. controle negativo (água), 3. umbu 4. caju; 5. controle positivo, 6. controle negativo, 7. umbu, 8. caju; 9. controle positivo, 10. controle negativo, 11-12 umbu, 13. caju. 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Espécies vegetais fruteiras do Semiárido Paraibano selecionadas para estudo de genes PR-5, indicando seus respectivos nomes científico e popular e indicação de família botânica. Fonte: Dados da pesquisa, 2015.	27
Tabela 2 – Sequências dos primers utilizados nas PCRs.....	33
Tabela 3 – Similaridade via BLASTx de possíveis proteínas PR-5 de Carica papaya com outras disponíveis no GenBank.	35
Tabela 4 Dados de validação do modelo proposto para CpTLP pelos critérios estereoquímicos de PROCHECK para ângulo e torsão, indicando as ligações de pontes de sulfeto entre as cisteínas e suas distâncias.	39
Tabela 5 Quantificação e análise de pureza das amostras de DNA extraído de 08 espécies pelo protocolo CTAB, utilizando leituras de absorvância de 260 e 280 nm....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CpGDB	Plant Data Bank
BLASTx	Basic Local Alignment Search Tool
PR	Pathogenesis-Related
ORF	Open Reading Frame Finder
CpTLP	<i>Carica papaya</i> Thaumatin-Like Protein
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PDB	Protein Data Bank
QMEAN	Server for Model Quality Estimation
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Hipótese	18
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo Geral	19
2.2	Objetivos específicos	19
3	REFERENCIAL TEÓRICO	20
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	Busca por genes <i>PR-5</i> de fruteiras presentes no Semiárido	27
4.2	Caracterização molecular <i>in silico</i> de genes <i>PR-5</i> de fruteiras do Semiárido.....	27
4.3	Caracterização proteômica de possíveis proteínas <i>PR-5</i> de fruteiras	28
4.4	Identificação e coleta de material foliar de fruteiras no Seminário Paraibano ..	28
4.5	Extração de DNAs genômicos das plantas selecionadas	30
4.6	Eletroforese horizontal em gel de agarose	31
4.7	Estimativa da quantidade e pureza do DNA por espectrofotometria	31
4.8	Digestão com ribonuclease A.....	32
4.9	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1	Prospecção <i>in silico</i> de genes <i>PR-5</i>	34
5.1.1	Caracterização molecular de gene <i>PR-5</i> de <i>Carica papaya</i>	35
5.1.2	Modelagem molecular da estrutura 3D de CpTLP	37
5.1.3	Atividade funcional baseadas na predição do sítio ativo de CpTLP	40
5.2	Prospecção <i>in planta</i> de genes <i>PR-5</i> em fruteiras do Semiárido Paraibano.....	41
5.2.1	Estimativa de quantidade e qualidade dos DNAs genômicos extraídos de fruteiras do semiárido.....	41
5.2.2	Eliminação de RNAs contaminantes de preparações de DNAs genômicos.....	42
5.2.3	Estimativa da quantidade dos DNAs por espectrometria.	43
5.2.4	Amplificação de fragmentos de DNA por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) 44	
	CONCLUSÃO	47
	PERSPECTIVA.....	48
	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores exportadores de *commodities* na área da agricultura, como soja, suco de citros, café, entre outras. Contudo, fitopatógenos e condições adversas ainda provocam doenças que afetam a produção agrícola e seus custos. A larga distribuição de fitopatógenos, tais como vírus, fungos e bactérias, causam infecções que resultam em várias perdas em culturas economicamente importantes (AGRIOS, 1997; FERREIRA et al., 2007). É de fundamental importância procurar soluções para tais problemas, através de alternativas diferentes daquelas que o mercado disponibiliza, incluindo novos mecanismos de resistência da planta a estresses bióticos e abióticos. A busca por novas proteínas que participem das respostas de defesa natural em plantas do Semiárido, pode trazer contribuições inovadoras para controlar patógenos em plantas comercialmente relevantes.

Métodos de controle de fitopatógenos vêm sendo patenteados envolvendo genes que codificam proteínas PR-5 do tipo osmotina. A osmotina é uma das mais notáveis proteínas que se relacionam à patogênese de plantas acumuladas sob várias condições de estresse, tais como infecções e condições ambientais adversas (SUBRAMANYAM et al., 2011). Esta proteína foi primeiro isolada a partir de cultura de células de fumo (*Nicotiana tabacum*) sob condições de adaptação a estresse osmótico induzido por sais, NaCl e KCl (SINGH et al., 1985), o que deu origem ao seu nome, e posteriormente em folhas de fumo infectadas por TMV (vírus do mosaico do fumo (VAN LOON, E VAN KAN, 1970). Desde esse estudo, diversos genes do tipo osmotina já foram isolados e estudados a partir de plantas (VELAZHAHAN et al., 1999; CAMPOS et al., 2002; PATADE et al., 2012 SHARMA et al., 2011). Proteínas osmotinas fazem parte de uma família de proteínas antimicrobianas com várias funções nas plantas, conhecidas como proteínas PR-5, cujos membros são referidos como taumatinas, osmotinas, permatinas e zeamatinas. Enquanto as proteínas taumatinas são comumente ácidas, encontradas no espaço extracelular, as osmotinas são proteínas básicas, encontradas no citosol. A família de proteínas PR-5 faz parte de um grupo maior denominado de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR), que está classificado atualmente em 17 famílias de PR-1 a PR-17 (VAN LOON et al., 2006), e, muitas vezes, a família de proteínas PR-5 são referidas como TLPs (thaumatin-like proteins).

As proteínas TLPs têm sido encontradas em muitas monocotiledôneas e dicotiledôneas e se expressam em resposta a pressões ambientais, infecções e sinais de desenvolvimento. A produção de algumas TLPs é encontrada especificamente em órgãos como semente, frutas, raízes e flores (FILS-LYCANON et al., 1996; KUBOYAMA et al., 1997; TATTERSALL et al., 1997).

As proteínas da família PR-5 apresentam atividade antifúngica *in vitro* proeminente e *in vivo* (JAMI et al., 2007) e, por tal motivo, genes que codificam estas proteínas têm sido indicados para aplicações biotecnológicas em transgenia de plantas, por exemplo. Plantas transgênicas que expressam proteínas PR-5 apresentam atraso no surgimento de sintomas de doenças, indicando o seu potencial como genes promissores para a engenharia genética de plantas (PATADE et al., 2012, SHARMA et al., 2011). Existem pesquisas que envolvem isolados de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e esferoplastos, que demonstraram a ação da proteínas PR-5 nas membranas plasmáticas dos fungos, tendo-as como alvo de sua ação, essas proteínas aumentam a permeabilidade da membrana do fungo (ANZLOVAR et al; 2003). A recente e importante descoberta de que um gene que codifica uma proteína do tipo osmotina, isolado a partir de *Solanum nigrum* var. *americanum* (SnOLP), conferiu a plantas de soja, tolerância a seca (WEBER et al., 2014).

Portanto, direcionar esforços para o isolamento e a identificação de genes relacionados à tolerância a estresses biótico e abiótico é de máxima importância para o nordeste e o país, devido à importância da descoberta de novos genes que produzam respostas de resistência a adversidades ambientais, tais como a seca, salinidade e ataques de patógenos, com potenciais aplicações nas áreas da agricultura e saúde. Destaca-se a relevante busca por novos genes com potencial antimicrobiano e fármaco em plantas do Semiárido, ainda pouco estudadas, podendo contribuir para elaboração de estratégias da engenharia genética para resistência a estresses bióticos e abióticos, e também para a saúde humana. Os genes não são patenteáveis, mas as suas aplicações podem ser, sendo assim, este trabalho objetiva prospectar genes *PR-5* em plantas fruteiras do semiárido, visando aplicações biotecnológicas. Embora genes *PR-5* sejam amplamente estudados em diversas espécies vegetais, os estudos desses genes em fruteiras do Semiárido permanecem escassos, o que incrementa a importância de estudos de prospecção de genes *PR-5* nas referidas fruteiras, pois os genes evoluem em resposta a adaptação às condições ambientais.

1.1 Hipótese

Especula-se que genes *PR-5* estejam naturalmente presentes nos genomas de todas as plantas, fazendo parte da imunidade nata, em especial nas plantas de Caatinga, que resistem a condições abióticas extremas, como a seca e a salinidade. Espera-se nesse estudo isolar DNAs genômicos de fruteiras do semiárido e amplificar fragmentos gênicos usando primers específicos para genes *PR-5*. O conhecimento de estruturas primárias de genes *PR-5* de fruteiras do Semiárido e as proteínas codificadas por eles pode contribuir para o entendimento da função das referidas proteínas nestas plantas, além de analisar o seu potencial para aplicações biotecnológicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Prospectar genes *PR-5* em plantas fruteiras presentes no Semiárido Paraibano.

2.2 Objetivos específicos

1. Realizar prospecção e caracterização molecular *in silico* de genes *PR-5* isolados de genomas das fruteiras selecionadas, usando bancos de dados genômicos disponíveis *online*.

2. Realizar prospecção *in planta* de genes *PR-5* a partir de genomas das fruteiras selecionadas no Semiárido Paraibano, usando PCR com primers específicos.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 A defesa de plantas mediada por genes *PR*

As plantas são frequentemente sujeitas a várias condições de estresses bióticos e abióticos que conduzem à uma série de alterações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares, afetando negativamente a sua sobrevivência, crescimento e produtividade. A resistência das plantas aos referidos estresses 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 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). Atuando como uma primeira linha de defesa das plantas, proteínas *PR* estão atualmente classificadas em 17 famílias, de *PR*-1 a *PR*-17 (BOL et al., 1990; LINTHOTST e VAN LOON, 1991; VAN LOON et al., 1999; SINHA et al., 2014).

Em sua grande maioria, genes *PR* têm 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, sendo as proteínas expressas acumuladas em diversos órgãos das plantas, incluindo caules, flores e raízes, com maior abundância nas folhas (NOGUEIRA et al., 2012). 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 (VAN LOON e KAMMEN, 1970).

3.2 Funções de proteínas *PR*

Várias famílias de proteínas *PR* são encontradas como isoformas ácidas, localizadas nos vacúolos e espaços extracelulares e básicas, encontradas no citosol. As formas extracelulares têm função imediata na defesa, atuando no patógeno antes de sua penetração na célula, com ação direta sobre as hifas, por exemplo. Esta ação também provoca a liberação de eliciadores de oligossacarídeos, a partir das paredes dos fúngicas

os quais podem levar à ativação de outros mecanismos de defesa, já as formas intracelulares certamente atuam tardiamente na defesa (CAMPOS, 2000). A ação antimicrobiana direta por meio da permeabilização da membrana parece estar relacionada a PRs de natureza básica com α -hélice anfipática, permitindo a ligação destas a membrana e posterior inclusão na bicamada lipídica (VAN LOON et al., 1994; VAN LOON et al., 2006; STANGARLIN et al., 2011).

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).

Por outro lado, a maioria das PRs de ação indireta desempenha papel importante no processo de indução de resistência. Dentre as funções relacionadas destaca-se: ação preventiva contra a penetração de patógenos, modulação oxidativa de componentes da parede celular (peroxidases PR-9), ou envolvimento na transdução de sinais durante a interação do patógeno com a planta hospedeira, como é o caso da ação das oxidases de oxalato (PR-15) e de proteínas não específicas relacionadas com o transporte de lipídeos (PR-14) (VAN LOON et al., 1994; VAN LOON et al., 2006; STANGARLIN et al., 2011).

A atividade enzimática como mecanismos de ação está associada a um pequeno número de famílias de PRs tais como glucanases (PR-2), quitinases (PR-3, PR-8 e PR-11), peroxidases (PR-9), ribonucleases (PR-10 e PR-4), endoproteínase (PR-7) e a ação inibitória pela atividade de inibidores enzimáticos (PR-6). A atividade inibitória de proteases e α -amilases é atribuída às famílias PR-5, PR-12 e PR-14. Os mecanismos de ação das PRs são baseados em atividades hidrolíticas sobre a parede celular, toxicidade direta, permeabilização da membrana plasmática, sinalização no processo de defesa ou inibição, como por exemplo, de enzimas do trato digestório de insetos. Nesse contexto, quitinases (PR-3, PR-4, PR-8 e PR-11) e glucanases (PR-2) têm ação direta sobre os componentes 1,3- β -glucano e quitina da parede celular de fungos, enquanto que PR-5, PR-12, PR-13 e PR-14 interferem com a membrana plasmática (VAN LOON et al., 1994; VAN LOON et al., 2006; STANGARLIN et al., 2011).

Segundo Pereira 2008 as β -1,3-glucanas, pertencentes as PR-2, são capazes de clivar glucana, um outro componente importante da parede célula de fungos e oomicetos. Agindo diretamente sobre o patógeno, estas proteínas causam lise da hifa e inibição do crescimento de fungos patogênicos. Atividade indireta dessas proteínas também pode ser obtida por meio da liberação de oligômeros de glucana e quitina, que são eficientes eliciadores de respostas de defesa de plantas (CAMPOS, 2000).

3.3 A família de proteínas PR-5

A família proteínas PR-5 é constituída por proteínas ácidas e básicas, de acordo com seus pontos isoelétricos, as quais desempenham atividades semelhantes mesmo sendo encontradas nos meios extra e intracelulares, respectivamente. De modo geral, proteínas dessa família também tem sido denominadas de taumatina, uma vez que elas mostram uma homologia estrutural com a proteína taumatina isolada a partir de *Thaumatococcus danielli* (VANDER e LOEVE, 1972; EDENS et al., 1982; CORNELISSEN et al., 1986; VELAZHAHAN et al., 1999). Apesar da sua elevada semelhança de sequências entre PR-5 e taumatina, mesmo uma pequena alteração nos aminoácidos destas proteínas leva a diversas funções, em que a taumatina nativa apresenta sabor doce, mas não exibe atividade antifúngica (OGATA et al., 1992; ZEMANEK e WASSERMAN, 1995). Proteínas PR-5 com similaridade com taumatina são chamadas de TLPs (thaumatin-like proteins).

Membros da família de proteínas PR-5 também são chamados de osmotina, zeamatina, entre outros. Contrariamente a taumatina, zeamatina não tem um gosto doce, mas apresenta alta atividade antifúngica (MALEHORN et al., 1994). Já a osmotina apresenta respostas a ambos os estresses bióticos e abióticos, que facilitam a compartimentalização de íons ou solutos e exibem atividades antifúngicas (SINGH et al., 1985; ABAD et al., 1996; ANZLOVAR et al., 1998; YUN et al., 1997; BRAY et al., 2000; IBEAS et al., 2000).

Proteínas PR-5 são acumuladas em plantas após 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 (ELKEREMY 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 liga a β -1,3-glucana e tem atividade detectável *in vitro* de β -1,3-glucanase (GRENIER et al., 1999; MENUBOUAOUICHE et al., 2003). E, ainda, uma osmotina de fumo induz apoptose em *Saccharomyces cerevisiae* (NARASIMHAN et al., 2001; ALMEIDA et al., 2008).

A superexpressão 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; ELKEREAMY et al., 2011). Recentes estudos com plantas transgênicas demonstraram que essa proteína atua de modo eficaz na inibição de hifas e crescimento de esporos de fungos e oomicetos no local da infecção (ELKEREAMY et al., 2011). 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), tendo sido comprovado recentemente pela demonstração de que uma proteína osmotina de *Solanum nigrum* conferiu a plantas transgênicas de soja resistência a seca (WEBER et al., 2014). Portanto, a superexpressão de genes *PR-5* em plantas transgênicas é conhecida para conferir tolerância contra vários estresses bióticos e abióticos incluindo frio, salinidade e seca (PATADE et al., 2013).

Neste sentido, buscar genes PR-5 em plantas que evoluíram sob condições de seca pode trazer uma característica adicional de adaptabilidade, além de sua atividade antimicrobiana, o que pode ser extremamente importante na geração de estratégias de resistência a patógenos fúngicos associada a resistência a seca.

3.4 Plantas frutíferas do Semiárido

A existência de uma grande variedade de plantas frutíferas de ocorrência no bioma Semiárido e/ou adaptadas às condições de sequeiro, de sabores exóticos, de grande apelo entre as principais tendências atuais de consumo de produtos naturais, reforça a ideia da coleta, caracterização e cultivo em escala comercial dessas fruteiras. Dentre elas merecem destaque o mamão (*Carica papaya*), seriguela (*Spondias purpúrea*) aceroleira (*Mapliphia glabra*), umbuzeiro (*Spondias tuberosa*), cajueiro

(*Anacardium occidentale*), pinha (*Annona squamosa*), goiabeira (*Psidium guajava*) e romãzeiro (*Punica granatum*).

Das espécies produzidas, o umbuzeiro é a fruteira de maior importância para o Nordeste. Além do uso na alimentação humana e animal pode ser utilizada como porta-enxerto de outras espécies do mesmo gênero, tais como: a seriguela (*Spondias purpurea*), o cajá-manga ou cajarana (*Spondias cytherea*) e o umbu-cajá (*Spondias* sp.) (CAIRES et al., 2015). Assim, o umbuzeiro permite maior diversificação de uma fruticultura comercial nas áreas dependentes de chuva, bem como o aproveitamento dos frutos para produção de doces e geleias entre outros derivados.

O cultivo sistemático dessas fruteiras poderá, ainda, amenizar os efeitos das irregularidades no regime das chuvas, pela resistência que essas espécies apresentam à seca. A integração da fruticultura às atividades das pequenas indústrias de beneficiamento e processamento dos frutos, com agregação de valor aos produtos.

Apesar do grande potencial econômico destas espécies, essas plantas apresentam diversos problemas fitossanitários, e, de modo geral, estudos genômicos envolvendo plantas nativas da região semiárida são inexistentes ou escassos. Como tem sido observado nesta era pós-genômica, informações sobre os genes envolvidos em diversas respostas das plantas a estresses bióticos e abióticos têm contribuído não somente na elucidação dos mecanismos de respostas bem como na elaboração de novas estratégias biotecnológicas aplicadas a agricultura.

3.5 Bioinformática

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 Humano, 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). 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 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 biológico (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 protéicas, 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*.

Atualmente, ênfase tem sido dada 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 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. 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 Busca por genes *PR-5* de fruteiras presentes no Semiárido

Uma busca por genes *PR-5* foi realizada nos bancos de dados genômicos disponíveis online GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e PlantGDB (<http://www.plantgdb.org>). As tentativas de buscas foram realizadas nos bancos de dados “proteína” e “nucleotídeos”, por “palavras-chave” direcionadas para espécies vegetais fruteiras presentes no Semiárido Paraibano, usando várias combinações de “nome da proteína ou gene” *versus* “nome da família botânica, nome científico ou nome popular da espécie”. Como nomes de genes ou proteínas foram utilizados “thaumatin”, “osmotin”, “PR-5 protein” ou “pathogenesis-related-5 protein” *versus* as seguintes famílias botânicas: Malpighiaceae, Annonaceae, Caricaceae, Anacardiaceae, Punicaceae ou Myrtaceae (Tabela 1). Alternativamente, cada nome de gene/proteína foi combinado com os nomes científicos de fruteiras (*Malpighia glabra*, *Annona squamosa*, *Carica papaya*, *Anacardium occidentale*, *Spondias tuberosa*, *Punica granatum*, *Spondias purpúrea* e *Psidium guajava*).

Tabela 1 Espécies vegetais fruteiras do Semiárido Paraibano selecionadas para estudo de genes *PR-5*, indicando seus respectivos nomes científico e popular e indicação de família botânica. Fonte: Dados da pesquisa, 2015.

Nome popular	Família	Espécie
Acerola	Malpighiaceae	<i>Malpighia glabra</i>
Pinha	Annonaceae	<i>Annona squamosa</i>
Mamão	Caricaceae	<i>Carica papaya</i>
Caju	Anacardiaceae	<i>Anacardium occidentale</i>
Umbu	Anacardiaceae	<i>Spondias tuberosa</i>
Romã	Punicaceae	<i>Punica granatum</i>
Seriguela	Anacardiaceae	<i>Spondias purpúrea</i>
Goiaba	Myrtaceae	<i>Psidium guajava</i>

Fonte: Dados da pesquisa, 2015.

4.2 Caracterização molecular *in silico* de genes *PR-5* de fruteiras do Semiárido

As sequências gênicas encontradas agrupadas por clusterização com auxílio do Servidor e CAP3 (<http://doua.prabi.fr/software/cap3>) e posteriormente analisadas quanto à similaridade com as sequências de proteínas de outros organismos depositadas no GenBank/NCBI, utilizando o programa BLASTx (ALTSCHUL et al., 1990).

Sequências de aminoácidos deduzidas foram comparadas com sequências similares por alinhamento múltiplo, para visualização de resíduos conservados, usando o programa Clustalw (www.genome.jp/tools/clustal). A análise das sequências para genes completos foi feita utilizando o Servidor ORFFinder (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf).

4.3 Caracterização proteômica de possíveis proteínas PR-5 de fruteiras

Análises de proteômica foram realizadas para estruturas primária e terciária de proteínas preditas a partir dos genes *PR-5* encontrados, incluindo: (i) presença de possíveis sítios de peptídeos sinais, usando o programa SignalP (PETERSON et al., 2011); (ii) parâmetros físicos e químicos das proteínas, utilizando a ferramenta ProtParam (GASTEIGER et al., 2005); (iii) construção de modelo tridimensional por modelagem molecular por homologia, usando o servidor Swiss-Model e comando AutoMatedmo (ARNOLD et al., 2016), tendo o modelo construído sido validado pelos critérios para campos de força de Q-MEAN6 (BENKERT; BIASINI; SCHWED, 2011) e estereoquímicos de Ramachandran usando o Servidor PROCHEK (LASKOWIWSKI et al., 1993) e visualizado usando o VMD (Visual-Molecular Dynamics) (HUMPHREY; DALKE; SCHAULTEN, 1996); e (iv) predição de sítio ativo, utilizando o Servidor Ghecon (KAWABATA, 2010).

4.4 Identificação e coleta de material foliar de fruteiras no Seminário Paraibano

As 08 espécies vegetais fruteiras nativas ou adaptadas ao Semiárido Paraibano indicadas na Tabela 1 foram encontradas no Horto Florestal Olho d'Água da Bica, no Centro de Educação e Saúde (CES) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), município de Cuité PB (Figura 1), e identificadas pelos nomes científico e popular (Figura 2). Tecido foliar foi coletado de cada uma das espécies sempre um dia antes da extração de DNA genômico.. Para cada planta foram coletadas folhas jovens, embrulhadas em papel alumínio, etiquetadas e transportadas em 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,

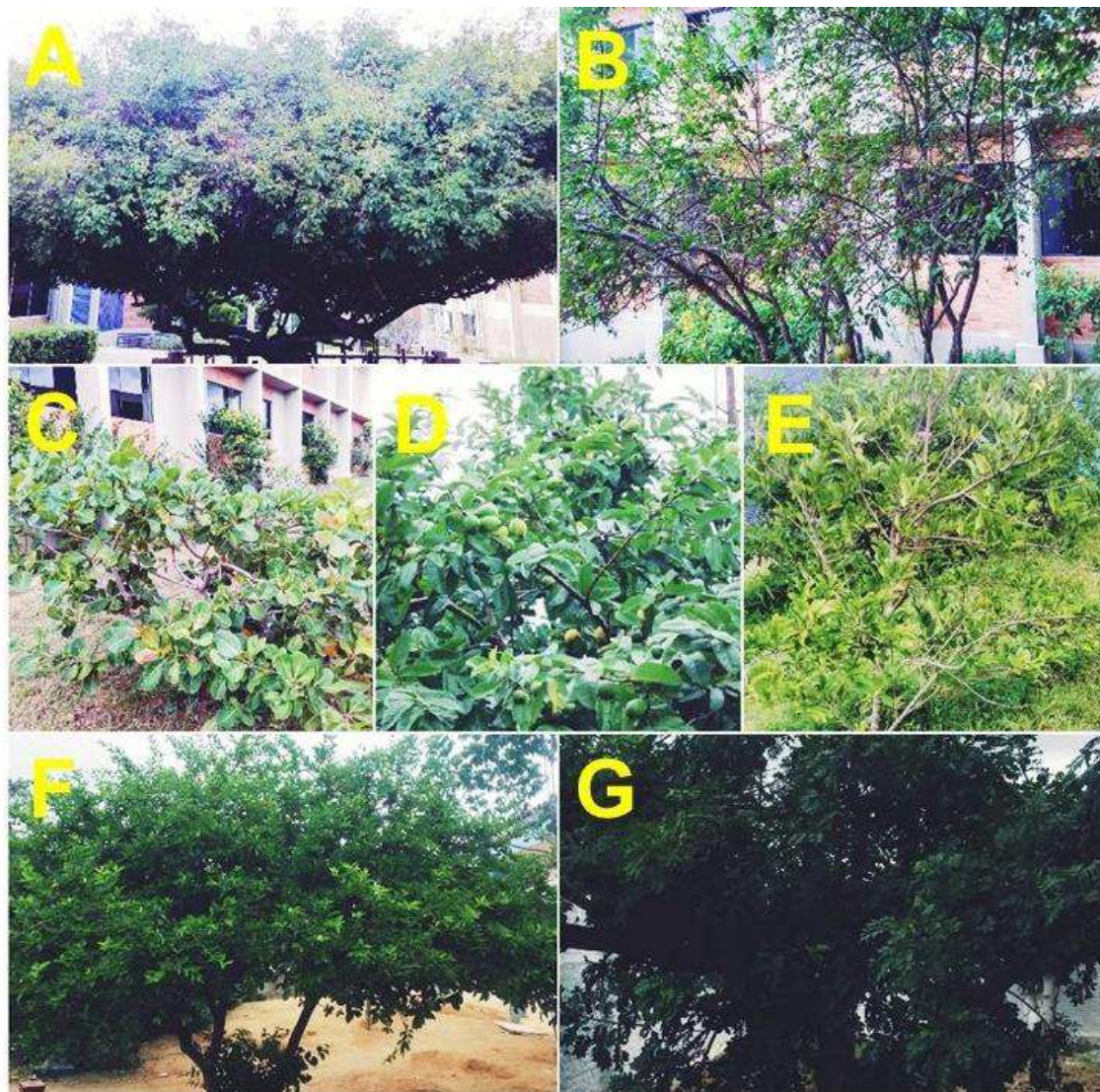
embrulhadas novamente no papel alumínio e armazenadas em freezer a -20°C até o momento da extração.

Figura 1 – Vista parcial do Horto Florestal Olho D'Água da Bica, Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, município de Cuité PB.



Fonte: Google imagens.

Figura 2 – Ilustração das espécies vegetais fruteiras in situ cujo DNA foi extraído. (A) umbuzeiro (*Spondias tuberosa*); (B) romãneria (*Punica granatum*); (C) cajueiro (*Anacardium occidentale*); (D) goiabeira (*Psidium guajava*); (E) pinha (*Annona squamosa*); (F) aceroleira (*Maplphighia glabra*); (G) seriguela (*Spondias purpurea*).



Fotografias: Morgana Abreu, 2016.

4.5 Extração de DNAs genômicos das plantas selecionadas

DNAs totais das 08 fruteiras identificadas na Tabela 1/Figura 2, foram extraídos usando tampão CTAB (2% de CTAB, 1,4 M de NaCl; 200 mM de Tris-Hcl pH 8.0; 20 mM de EDTA pH 8.0). Em torno de 1 grama de tecido vegetal foliar jovem foi macerado utilizando cadinho e pistilo autoclavados e congelados, ao qual foi adicionado o tampão de extração CTAB junto com 1% de P.V.P (Polivinilpirrolidona). O extrato foi distribuído em alíquotas de 800 μ L em eppendorf de 2 mL. Na capela de exaustão

adicionou-se à amostra, 2 μL de β -mercaptoetanol e 10 ng de Proteinase K (AMRESCO). A amostra foi aquecida a 65°C em banho-maria durante 15 minutos, sendo gentilmente misturada a cada 5 min. Em seguida, às amostras foi adicionado igual volume de clorofil (Clorofórmio:álcool isoamílico, 24:1), misturado no vórtex e centrifugado a 12000 rpm, durante 10 minutos à 20°C . O sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo eppendorf 1,5 mL, onde o DNA foi precipitado usando 800 μL de isopropanol gelado, durante 2 horas à -20°C e, em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm, durante 10 min à 20°C . O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado em 500 μL de Etanol 70% gelado, centrifugados a 12000 rpm, durante 5 minutos à 20°C , para remoção de sais contaminantes. Após descartar o sobrenadante, o pellet foi seco à temperatura ambiente na capela de exaustão e o DNA foi resuspendido em 100 μL de água milli-Q.

4.6 Eletroforese horizontal em gel de agarose

Gel de agarose foi preparado na concentração de 0,8%, em tampão T.A.E. (100 mM de Tris HCl pH 8,0, 57.1 mL de ácido acético glacial e 500mM de EDTA pH 7,5) 1 X, geleificado em microondas por 5 minutos. Após o gel atingir a temperatura ideal (40°C), e foi colorido com 1% de brometo de etídio. O gel foi vertido na cama de eletroforese, aguardando aproximadamente 30 minutos para a solidificação e retirada do pente. Depois de encaixar a cama na cuba de eletroforese, foi adicionado T.A.E 1X.

Foi aplicado alíquotas de 5 μL de DNA juntamente com 1% de Tampão de amostra nos poços. A condição de corrida para a migração do DNA em gel foi realizada a 80 Voltz por 30 minutos. O gel foi visualizado posteriormente sob luz ultravioleta e documentado usando um Fotodocumentador Transiluminator Molecular Image LPIX (Loccus Biotecnologia).

4.7 Estimativa da quantidade e pureza do DNA por espectrofotometria

As amostras de DNA extraídas a partir de folhas das 08 espécies vegetais foram quantificadas e sua pureza estimada usando uma pequena alíquota de 1 μL /cada em espectrofotômetro do tipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). As leituras ópticas foram realizadas para DNA, tendo a concentração padrão de 50 μg , nas absorvâncias de 230, 260 e 280nm.

4.8 Digestão com ribonuclease A

O RNA contaminante presente nas amostras de DNA foi eliminado por digestão com enzima ribonuclease A (RNase A), de acordo com as instruções do fabricante (AMRESCO). Os volumes totais de cada amostra de DNA foram ajustados para 390 μL com T.E. (1 M de Tris HCl pH 8.0 e 0,5 M de EDTA pH 7.5) e as reações de digestão ocorreram em volumes final de 400 μL . As amostras foram armazenadas na B.O.D. por 2 horas, à 37 °C.

Os DNAs digeridos foram precipitados adicionando 500 mM de NaCl e 1000 μL de etanol absoluto gelado e o precipitado foi centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 500 μL etanol 75% gelado e centrifugado a 12000 rpm a 5 min. Após descartar o sobrenadante, o pellet foi seco a temperatura ambiente na capela de exaustão e os DNAs foram ressuspensos em 100 μL de Tris HCl 2,5 mM pH 8.0.

4.9 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Reações da polimerase foram realizados com 6 (seis) combinações de pares de primers específicos para genes PR-5 descritas no Quadro 1. As sequências dos primers utilizados estão indicadas na Tabela 2, sendo os primers PSS1/PCTP1 descritos por CAMPOS, et al, (2002). As condições para as reações de polimerização foram realizadas por meio de um preparo de um Master mix para 20 reações de 25 μL , utilizando 1 X de Tampão PCR Buffer minus Mg (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl_2 (Invitrogen), 0,2 mM de dNTPs, 0,25 mM de Primer direto (forward), 0,25 mM de Primer reverso; 1,5 U da enzima Taq DNA Polimerase Recombinante (Invitrogen), e 50 ng de DNA. As reações ocorreram sob as seguintes condições térmicas: 1 ciclo de desnaturação inicial a 95° por 1 min, 30 ciclos de desnaturação (95 °C por 45 seg) anelamento (50 °C por 15 seg); extensão (72 °C por 5 min). O diagnóstico das PCRs foi realizado por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% sob luz ultravioleta e documentados, conforme descrito no item 4.3, usando 20 μL de cada reação.

Quadro 1 – Combinações de primers utilizados nas PCRs, indicando os DNAs utilizados como molde para amplificação de fragmentos de genes *PR-5*.

Reverse Forward	PCTP1	PCTP2	PCTP3	PPM4	PPM6
PPS1	Todas da Tabela 1	Todas da Tabela 1	Caju Umbu	Caju Umbu	Caju Umbu
PPS2		Todas da Tabela 1			

Fonte: Dados da pesquisa, 2016.

Tabela 2 – Sequências dos primers utilizados nas PCRs.

Primer*	Código do Primer	Direção	Sequência de nucleotídeos (5'-3')**
PPS1	P1	Forward	CGCGGATCCATGGGCTACTTGAGATCT
PCTP1	P2	Reverse	CCC AAGCTTT ACTTGGCCACTTCATC
PCTP3	P3	Reverse	CCC AAGCTT AATGHWCAKKTGTTGTCC
PPM4	P4	Reverse	CCC AAGCTT AATTCCCGTCTTGCACTGG
PPS2	P5	Foward	CGCGGATCCATGGCTCGCTTCACTATCC
PCTP2	P6	Reverse	CCC AAGCTT AATGCACAGGTGTTGTCC
PPM6	P7	Reverse	CCC AAGCTT AATTCCCGTYTTGYAYTGG

Fonte: Dados da pesquisa, 2016.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Prospecção *in silico* de genes *PR-5*

Genes do tipo *PR-5* isolados a partir de espécies vegetais fruteiras presentes no Semiárido Paraibano ainda não estão disponíveis no maior banco de dados genômicos mundial, o GenBank. Nenhuma sequência gênica foi encontrada quando cada uma das palavras-chave “thaumatin”, “osmotin”, “PR-5 protein” ou “pathogenesis-related-5 protein” foram pesquisadas em combinação com o “nome da família botânica (Malpighiaceae, Annonaceae, Caricaceae, Anacardiaceae, Punicaceae ou Myrtaceae) ou com o nome científico (*Malpighia glabra*, *Annona squamosa*, *Carica papaya*, *Anacardium occidentale*, *Spondias tuberosa*, *Punica granatum*, *Spondias purpurea* e *Psidium guajava*). Portanto, para as fruteiras nativas ou adaptadas a região do Semiárido Paraibano acerola, pinha, mamão, caju, umbu, romã, seriguela e goiaba não foram encontrados genes *PR-5* disponíveis *online* no GenBank, indicando que se faz necessário investir esforços para compreender e disponibilizar genes de defesa de plantas adaptadas às condições adversas de clima e solo da referida região.

Similarmente, esses genes também não foram encontrados no banco de dados PlantGDB, exceto apenas para a família Caricaceae, visto que um banco de dados para o genoma funcional de *Carica papaya* Linneaus (CpGDB) está disponível contendo sequências expressas de uma cultivar transgênica “SunUp” comercial resistente a vírus (MING et al., 2008). Este banco de dados foi usado para minerar sequências *PR-5* da referida espécie, usando as mesmas palavras-chave para genes/proteínas citadas acima, tendo sido encontrado um total de 19 sequências. Estas sequências foram clusterizadas em 02 contigs (Contig1 contendo 3 reads e Contig2 contendo apenas 2 reads) e 14 singletons. A análise de similaridade das sequências por BLASTx revelou que os dois contigs e 06 singletons apresentaram similaridade com outras *PR-5* de cacau (*Theobroma cacao*), jujuba (*Ziziphus jujuba*), videira (*Vitis riparia*), pera chinesa (*Pyrus x bretschneideri*) e algodão diploide (*Gossypium raimondii*), conforme Tabela 3. Entretanto, a maioria das sequências similares apresentaram comprimentos de tamanhos curtos e uma análise pontual nas sequências revelou que possivelmente a qualidade das sequências está comprometida para avaliação de possíveis genes, exceto o Contig1.

Tabela 3 – Similaridade via BLASTx de possíveis proteínas PR-5 de *Carica papaya* com outras disponíveis no GenBank.

Cluster	Comprimento (pb)	Organismo	Gene	Número de acesso	% de similaridade via BLASTx
Contig 1	1.290	<i>Theobroma cacao</i>	Osmotin 34	XP_007040164.1	87% (198/226)
Contig 2	929	<i>Ziziphus jujuba</i>	PREDICTE D: thaumatin-like protein	XP_015896184.1	75% (156/208)
Singlet 1	844	<i>Theobroma cacao</i>	Osmotin 34	XP_007040164.1	62% (142/226)
Singlet 2	744	<i>Theobroma cacao</i>	Osmotin 34	XP_007040164.1	78% (71/91)
Singlet 3	703	<i>Vitis riparia</i>	thaumatin	AAD55090.1	62% (74/119)
Singlet 4	398	<i>Theobroma cacao</i>	Osmotin 34	XP_007040164.1	80% (72/89)
Singlet 5	261	<i>Pyrus x bretschnederi</i>	PREDICTE D: thaumatin-like protein	XP_009341686.1	83% (70/84)
Singlet 6	597	<i>Gossypium raimondii</i>	PREDICTE D: osmotin-like protein	XP_012446484.1	66% (105/157)

Fonte: Dados da pesquisa, 2016.

5.1.1 Caracterização molecular de gene *PR-5* de *Carica papaya*

No Contig1 foi encontrada uma O.R.F (*open reading frame*) completa de um gene *PR-5* de *Carica papaya*, de 681 nucleotídeos de comprimento, denominado de CpTLP (*Carica papaya* thaumatin-like protein), que possivelmente codifica uma proteína predita de 226 aminoácidos (Figura 3). Esta proteína contém um possível sítio de clivagem proteica que indica a presença de um peptídeo sinal de 25 aminoácidos na região N-terminal, de acordo com o Servidor SignalP (PETERSEN et al., 2011). CpTLP não apresenta peptídeo carboxi-terminal e a região da proteína madura apresenta 201 aminoácidos com possível massa molecular de 21.8887 kDa e potencial isoelétrico de 6.87, sendo potencialmente ácida, de acordo com a análise de parâmetros físicos e químicos determinados no Servido ProtParam (GASTEIGER et al., 2005). Além disso, CpTLP apresenta as 16 cisteínas conservadas na família de PR-5, as quais normalmente estão envolvidas na formação de 8 pontes de sulfeto (CAMPOS et al., 2002). Diferente de CpTLP, uma proteína do tipo taumatina foi purificada e caracterizada a partir do latex de *Carica papaya* após indução por ferimento (LOOZEA et al., 2009), entretanto a proteína apresentou 22.137 kDa e foi estável em intervalo de pH de 2 a 10, potencialmente pode ser outra isoforma de PR-5 no genoma desta espécie.

Figura 3 – Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos predita da CpTLP, indicando em os códons de início (atg, azul) e término (tga, róseo) da tradução e sublinhados estão os 25 aminoácidos N-terminal de possível peptídeo sinal da proteína.

```

1 atgagtcaccttaaaaaactaccttaccacatcttgggcttactcttt
M S P L K T T L P I L G L L F
46 gttactctatctttcagattagccaatgcagccacatttcaagta
V T L S F R L A N A A T F Q V
91 aggaacaattgccccttcaactgtctgggcccagcaggagtgcccggt
R N N C P F T V W A A G V P G
136 ggcggaagacagttgaaccgaggggaaacatggattataaatgcc
G G R Q L N R G E T W I I N A
181 aatcctggctactgttcaagcccgtatttgggctcgaaccaattgc
N P G T V Q A R I W A R T N C
226 caatttgatgcttcaggcagaggtaggtgtcaaacctggtgactgc
Q F D A S G R G R C Q T G D C
271 aatggacttcttgagtgtaagagtttgggtgcccgaacaaact
N G L L E C K S F G A A P N A T
316 ctggctgagtatgccctggaccagttcatgcacctggatttcac
L A E Y A L D Q F M H L D F I
361 gatatctcgggtgatcgatgggtttaatgtgccaatggagttcagc
D I S V I D G F N V P M E F S
406 tcagtgtctgggcagtgccacgcccgggtgatcaagtgcaccgggtgac
S V S G Q C T R V I K C T G D
451 ctcacggggcagtgctccaaatgagctgaggggtgcaaggggggatgt
L I G Q C P N E L R V Q G G C
496 aatgggccttgtccagtttttaagacggaggagcactgctgcaac
N G P C P V F K T E E H C C N
541 tctggcaactgtggtccaacaaatctttcaagggtttttcaagcag
S G N C G P T N L S R F F K Q
586 aggtgtcctgatgcttacagttaccctaaggatgatcctaccagc
R C P D A Y S Y P K D D P T S
631 ttatttacttgcccaactggaactaactacaaagtgttttctgc
L F T C P T G T N Y K V V F C
676 ccttga 681
P *

```

Fonte: Dados da pesquisa, 2016.

CpTLP compartilha 84 a 87% de similaridade via BLASTx com outras proteínas PR-5 de cacau (*Theobroma cacao*), mamona (*Ricinus communis*), pinhão manso (*Jatropha curcas*), algodão diploide (*Gossypium raimondii*), populus (*Populus trichocarpa*) e couve nabissa (*Brassica napus*), sendo estas as melhores similaridades (Figura 4). A partir do alinhamento entre CpTLP com as proteínas similares foi possível visualizar as regiões conservadas, com destaque para as 16 cisteínas bem posicionadas entre as proteínas, o que pode ser indicativo de estrutura 3D funcional.

Figura 4 – Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos de CpTLP com as proteínas similares, gerado pelo Servidor ClustalW. TcOSM34 (Theobroma cacao osmotin 34, acesso nº XP_007040164.1); GrTLP (Gossypium raimondii thaumatin-like protein, acesso nº XP_012471838.1); RcTLP, (Ricinus communis thaumatin-like protein, acesso nº XP_002509750.1); JcPRPR (Jatropha curcas pathogenesis-related protein, acesso nº XP_012086965.1); PtP21 (Populus trichocarpa P21 family protein, acesso nº XP_006368746.1); BnBNA (Brassica napus, BnaA acesso nº CDY41250.1).

```

          1
RcTLP  --MTFLKSLLIFTFLLATLYFTLAQAATFAITNKCPYTVWAAASP  ---- GGGRRRLNTGET
JcPRE  --MSFFKSLPALSFLLFATLYFTFARAATFDITNKCTYTVWAAAKP  ---- GGGRRRLNTGET
PtP21  --MSSLKTLISIFSFLFAALHFPSVHAATFDITNKCPYTVWAAAKP  ---- GGGRQLNNGET
TcOSM  --MSSFKTLPTLSFLFVTLFS-LAHAATFDIRNNCPYTVWAAAVP  ---- GGGRPMNRGET
GrTLP  --MNPFKTLPTLSFLFVTLFS-LAHAATFDIRNNCPYTVWAAASP  ---- GGGKRLDQGOA
CpTLP  -MSPLKTTLPILGLLFVTLFRLANAATFQVRNNCPFTVWAAAGVP  ---- GGGRQLNRGET
BnBNA  MIYNKTLISIVFFFAFVILYFVILADAATFTVRCSEFPYVWAAATSA  

          2          3          4          5
RcTLP  WTISANPGITQARIWGRINCQFDASGRGKCE  

JcPRE  WTISANPGITEARIWARTNCQFDASGKGCET  

PtP21  WTISADPGITQARIWARTNCQFDGAGRGN  

TcOSM  WQISAAPGTTQARIWARTNCQFDASGRGK  

GrTLP  WQITAAAGTTQARIWARTKCNFDASGKGC  

CpTLP  WIINANPGTVQARIWARTNCQFDASGRGC  

BnBNA  WIINGDPGTTQARIWGRINCNF  

          6          7          8          9          10
RcTLP  HQDFIDISNIDGFNIPMEFSSASGCSRVIKCTADIIGQCPNELKVPGGCNGPCFVKTE  

JcPRE  HQDFIDISVIDGFNVPMEFSAASGSTRVIKCVGDLVGQCPNQLKVPGGCNGPCPQLKTE  

PtP21  NQDFIDISNIDGFNVPMEFSSASAGSTRVIKCTADIVGQCPNELKVPGGCNGPCFVFKTD  

TcOSM  NQDFIDISNIDGFNVPMEFSSNSPGSTRVIKCTADIVGQCPNELKVPGGCNGPCFVKTE  

GrTLP  HQDFIDISNIDGFNVPMEFSSNSRGSTRVIKCTADIVGQCPNQLKVPGGCNGPCFVKTE  

CpTLP  HLDIFIDISVIDGFNVPMEFSSVSGQSTRVIKCTGDLIGQCPNELRVQGGCNGPCFVKTE  

BnBNA  DQDFIDISVIDGFNIPMEFSSASGQSTRKIRCTGDI  

          11 12 13          14          15          16
RcTLP  EHCCNSGNCSPFTTFSRYFKERCPDAYSYPKDDPTSLFTCPTGTNYKVI  

JcPRE  EQCCNSGNCSPPTDLSKYFKERCPDAYSYPKDDPTSLFTCPTGTNYKVI  

PtP21  EYCCNSGTCGPTTFSKYFKERCPDAYSYPKDDPTSLFTCPTGTNYKVI  

TcOSM  EHCCNSGNCSPNTNFSKFFKDRCPDAYSYPKDDPTSLFTCPTGTNYKVI  

GrTLP  EHCCNSGNCQPTDFSRFFKERCPDAYSYPKDDPTSLFTCPTGTNYKVI  

CpTLP  EHCCNSGNCSPNTLSRFFKQRCPDAYSYPKDDPTSLFTCPTGTNYKVI  

BnBNA  EHCCNSGNCSPPLSMFFKQRCPDAYSYPKDDRTSLFTCPSTNYNVI

```

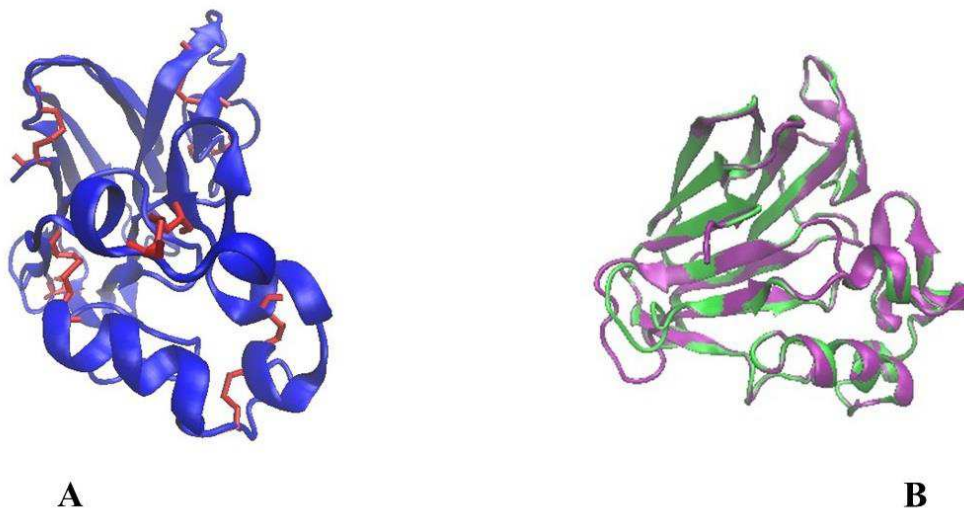
Fonte: Dados da pesquisa, 2016.

5.1.2 Modelagem molecular da estrutura 3D de CpTLP

Um modelo 3D foi proposto para CpTLP, construído a partir da estrutura primária da proteína madura, usando a estratégia de modelagem molecular comparativa, por meio do servidor Swiss-Model (Figura 5). A proteína possui ao todo oito cisteínas formadas por 16 cisteínas conservadas na família proteínas PR-5, as quais estão envolvidas na sua atividade (Figura 5A). O modelo proposto se ajustou bem ao molde PDB 4L2J, com 75 % de identidade, mostrando uma sobreposição idêntica em sua maior parte, divergindo apenas na região de alça, que é normalmente uma região variável que não está envolvida na atividade da proteína (Figura 5B). O molde é uma

PR-5 do tipo osmotina, antifúngica laticífera, de 206 aa de tamanho, isolada de *Calotropis procera*, planta conhecida popularmente como algodoeiro de seda (MORENO et al. publicado no PDB).

Figura 5 – Modelo molecular tridimensional da CpTLP. (A) Representação em faixas (Ribbon) obtidas pelo Programa VMD do modelo 3D proposto para CpTLP, indicando em vermelho a presença das 8 pontes de sulfeto previstas formadas pelos 16 resíduos de cisteína visualizados na Figura 4. (B) Sobreposição estrutural entre o modelo teórico para CpTLP (em verde) e o molde PDB 4L2J (em roxo).



Fonte: Dados da pesquisa, 2016.

A qualidade da estrutura do modelo proposto para CpTLP foi validada pelos critérios estereoquímicos e para campos de força, com base nos métodos de PROCHECK e por Q-MEAN6, respectivamente. De acordo com os critérios estereoquímicos para ângulo e torção (PROCHECK), pela tabela internacional para cristalografia, as ligações de pontes de sulfeto que ocorrem na CpTLP entre as 16 cisteínas e suas distâncias estão demonstradas na Tabela 3. A distancia calculada entre as ligações apresentaram valores bem abaixo de 6.0, o que é indicativo de acontecerem em condições nativas. Por outro lado, as posições quem ocorrem estas ligações estão exatamente de acordo com aquelas de outras PR-5 CAMPOS et al. (2002).

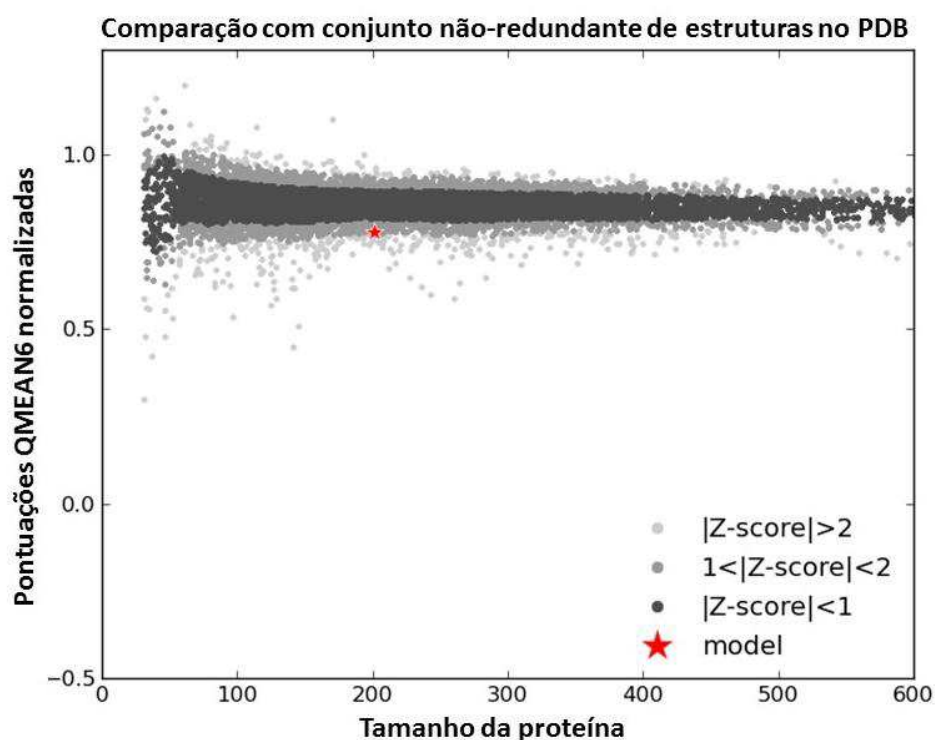
Tabela 4 Dados de validação do modelo proposto para CpTLP pelos critérios estereoquímicos de PROCHECK para ângulo e torsão, indicando as ligações de pontes de sulfeto entre as cisteínas e suas distâncias.

Cadeia Atômica	Ligações Resíduos	Distância (angstroms)
A SG	C9 com C200	1.97
A SG	C50 com C50	1.97
A SG	C116 com C189	1.98
A SG	C65 com C71	1.98
A SG	C144 com C153	2.01
A SG	C130 com C140	2.03
A SG	C122 com C172	2.03
A SG	C154 com C159	2.04

Fonte: Dados da pesquisa, 2016.

Com base nos 6 parâmetros de QMEAN para o modelo teórico de CpTLP, o modelo se enquadrou junto com outras estruturas de proteínas depositadas no PDB, indicando que a estrutura é satisfatória (Figura 6). Portanto, o modelo obtido é considerado ótimo do ponto de vista termodinâmico e de qualidade estrutural, apresentando pontuações que colocaram a proteína CpTLP junto com outras proteínas já elucidadas experimentalmente.

Figura 6 – Comparação de pontuações de QMEAN obtidas para o modelo de CpTLP (em vermelho) com as pontuações de estruturas de mesmo tamanho (preto/cinza) depositadas no PDB.

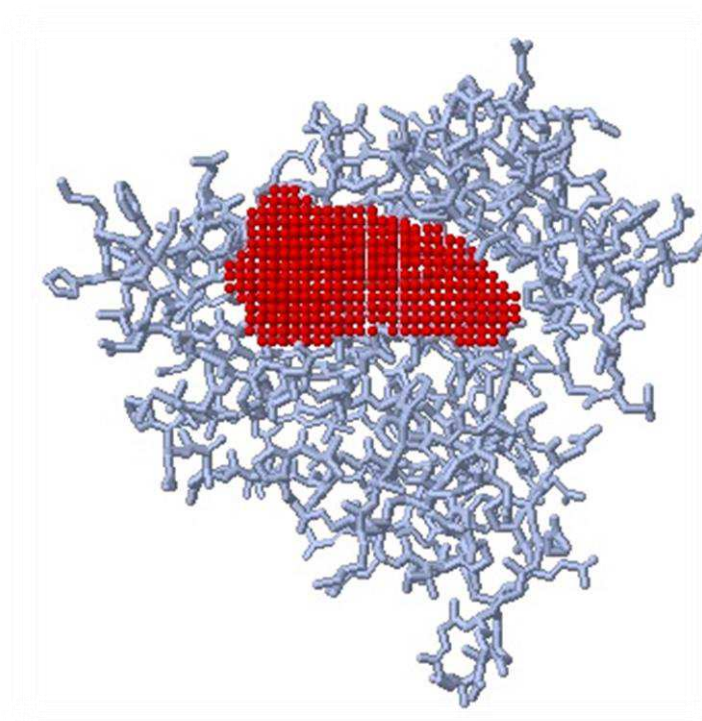


Fonte: Dados da pesquisa, 2016.

5.1.3 Atividade funcional baseadas na predição do sítio ativo de CpTLP

Uma vez que a estrutura 3D de CpTLP apresentou indicativos de que a proteína é funcional, uma análise de predição de sítio ativo foi realizada pelo método de Ghecon visando verificar esta hipótese. O sítio ativo de ligação de CpTLP foi gerado, e é possível ser visualizado como uma cavidade possivelmente funcional, que é semelhante a de outras PR-5 já estudadas (ABREU, 2015).

Figura 7 – Imagem representativa da estrutura 3D de CpTLP, indicando o provável sítio de ligação (em vermelho) de acordo com o Cluster1 previsto pelo programa Ghecon.

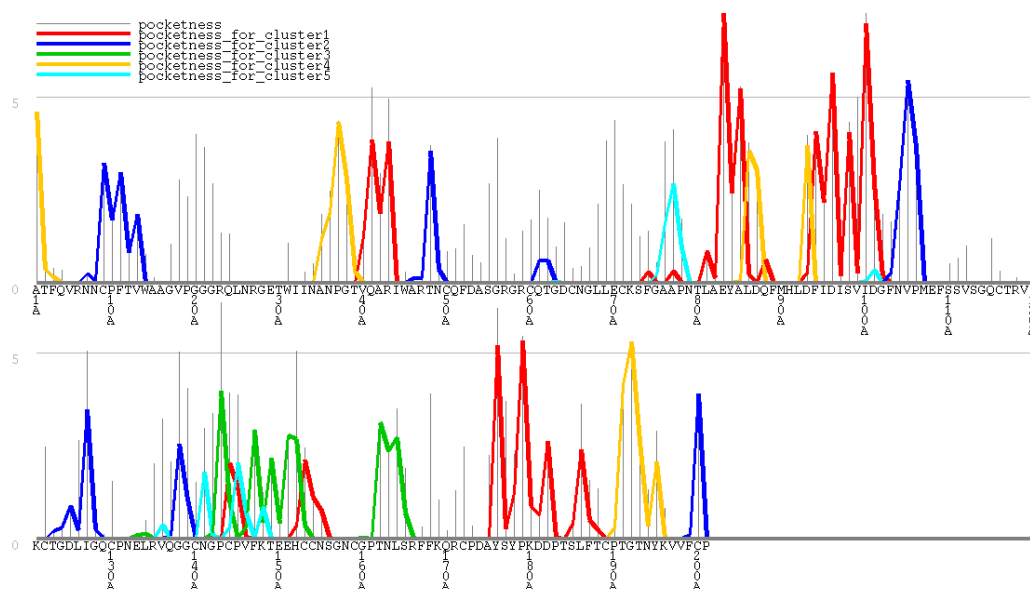


Fonte: Dados da pesquisa

Os aminoácidos responsáveis pela formação da cavidade do sítio ativo de CpTLP e que possuem capacidade de ligação a outras moléculas são: V40, Q42, A43, R44, F74, A77, E83, A85, Q88, P94, D96, I97, V98, I100, C144, C153, C154, N155, Y176, S177, P179, K180, D181, D182, S185, L186, F187, T188 (Figura 8). Observa-se a relação de cada *cluster* com os aminoácidos da proteína que procura regiões na proteína com capacidade para receber um ligante. Uma proteína PR-5 de citros, a PtTLP (*Poncirus trifoliata* thaumatin-like protein, apresenta atividade *in silico*, envolvidos nas

ligações a β -glucanase se ligando as 1,3 β -D-glucana, 1,4- β -D-glucana e 1,6- β -D-glucana, por meio de *docking* molecular (ABREU 2015). Portanto, estes são indicativos de que CpTLP deve apresentar atividade antifúngica.

Figura 8 – Resíduos que fazem parte da cavidade do sítio ativo de CpTLP com potencial para ligações (em vermelho), de acordo com a análise de Ghecon.



Fonte: Dados da pesquisa, 2016.

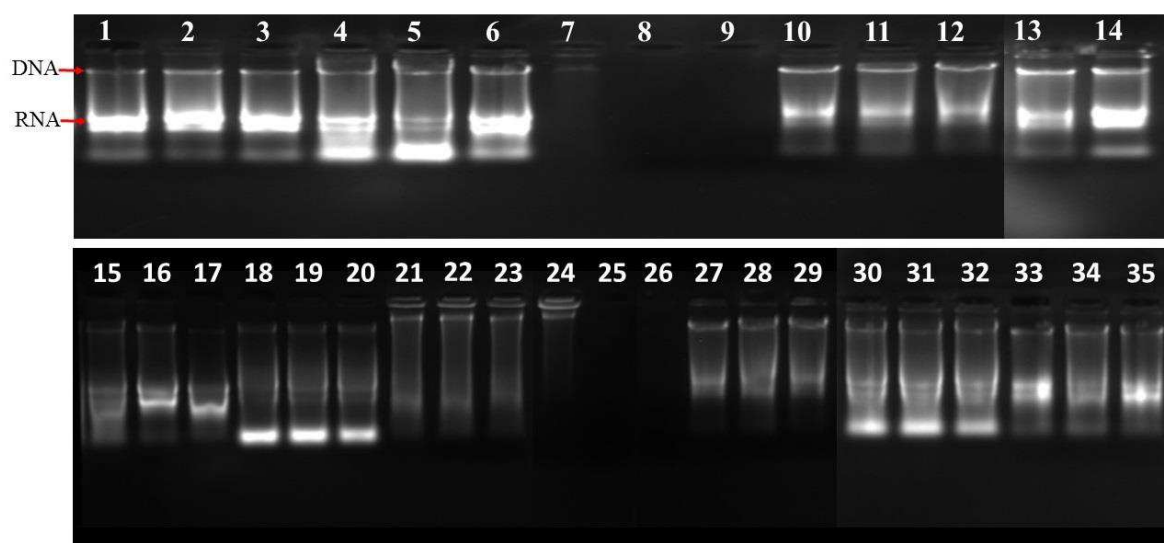
5.2 Prospecção *in planta* de genes *PR-5* em fruteiras do Semiárido Paraibano

Como foi possível comprovar a partir dos resultados deste trabalho, existe uma escassez de estudos sobre genes *PR-5* a partir de plantas fruteiras presentes no Semiárido. Levando em consideração a importância de genes de defesa adaptados ao clima e solo dessa região, este trabalho descreve, ainda, as etapas iniciais de esforços direcionados para o isolamento de genes *PR-5* presentes nos genomas de espécies vegetais fruteiras do Semiárido Paraibano.

5.2.1 Estimativa de quantidade e qualidade dos DNAs genômicos extraídos de fruteiras do semiárido

DNAs genômicos de 08 espécies vegetais fruteiras do semiárido foram extraídos com sucesso pelo método CTAB para todas as amostras (Figura 9). O diagnóstico da qualidade dos DNAs genômicos, isolados das 08 plantas pelo protocolo CTAB, foi feito por eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8%.

Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% de DNAs de plantas fruteiras presentes no Horto Florestal Olho d'Água da Bica/CES/UFCG. 1-6. Goiabeira; 7-12. Pinha; 13. Romãzeira; 14. Umbuzeiro; 15-17. Cajueiro; 18-20, Mamoeiro; 21-23. Aceroleira; 24-29, Pinha; 30-32. Umbuzeiro; 33-35. Romãzeira



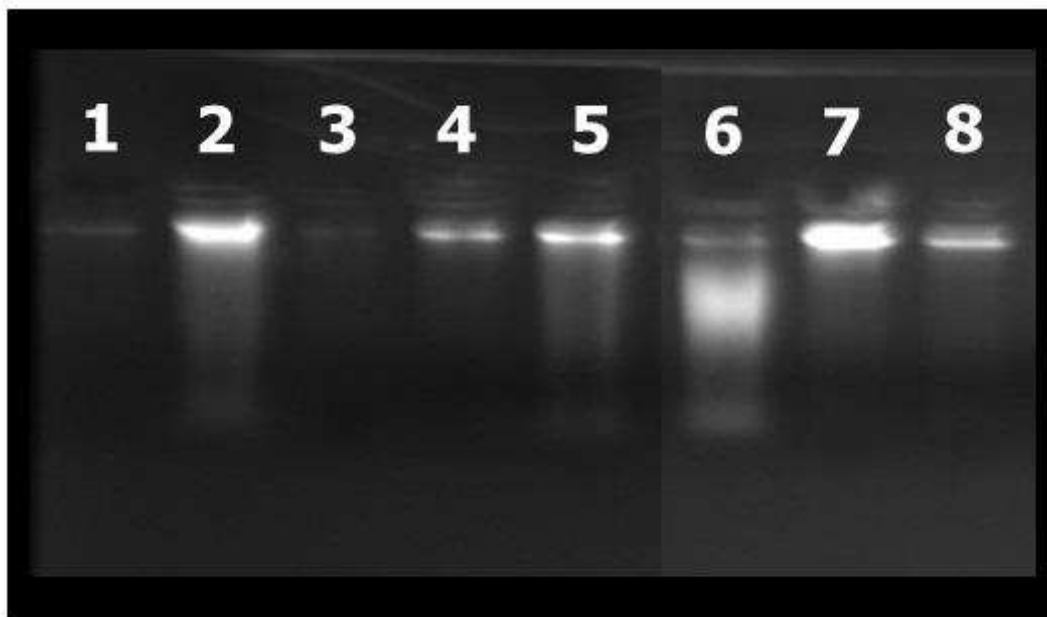
Fonte: dados da pesquisa, 2015

A partir da eletroforese foi possível observar a baixa concentração e degradação do material genético nas amostras do protocolo de extração usado. Das oito amostras de DNA extraídas pelo protocolo CTAB todas foram visualizadas no gel, apresentando uma boa concentração de DNA. Das oito amostras visualizadas no gel apenas 5 amostras não apresentaram uma fluorescência nítida, revelando uma concentração de DNA menor que as demais, correspondente a espécie de Pinha (*A. squamosa*), respectivamente. De modo geral, foram obtidos DNAs íntegros em quantidades visíveis em gel de agarose após eletroforese, porém apresentando um pouco de degradação e presença de RNAs contaminantes em algumas amostras. O problema da degradação dos DNAs isolados pode ser pela ausência de nitrogênio líquido durante o processo de maceração dos tecidos foliares ou componentes do tecido vegetal tenham contribuído para estes resultados, bem como pelas várias etapas de manuseio do protocolo.

5.2.2 Eliminação de RNAs contaminantes de preparações de DNAs genômicos

A digestão enzimática com RNase A efetivamente eliminou os RNAs contaminantes presentes na maioria das amostras de DNAs genômicos. As amostras digeridas livres de agentes contaminantes apresentam um melhor rendimento dos DNAs genômicos.

Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% de DNAs genômicos de fruteiras digeridos com ribonuclease A. 1. pinha; 2. umbuzeiro; 3. aceroleira; 4. cajueiro; 5. romãzeira; 6. mamoeiro; 7-8. Goiabeira.



Fonte: Dados da pesquisa, 2015.

5.2.3 Estimativa da quantidade dos DNAs por espectrometria.

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 fotodocumentador após exposição a UV dos ácidos nucleicos intercalados com brometo de etídio, e a espectrofotometria, realizando medições de absorvância a 260 nm e 280 nm com o uso de um espectrofotômetro Nanodrop.

Com base na análise da pureza e quantidade dos DNAs extraídos pelo método espectrofotometria em Nanodrop 2000, as amostras apresentaram uma média de concentração de DNA superior a 10 ng/ μ L com índice 260/280 igual a 1,8 para a maioria das amostras (Tabela 5).

Tabela 5 Quantificação e análise de pureza das amostras de DNA extraído de 08 espécies pelo protocolo CTAB, utilizando leituras de absorbância de 260 e 280 nm.

Amostras de DNA	Concentração de ácidos nucleicos ng/μL	260/280	260/230
Goiabeira	57,3 ng/μl	1,81	1,12
Goiabeira	129 ng/μl	1,74	0,99
Mamoeiro	154,9 ng/μl	-3,89	0,45
Pinha	9,9 ng/μl	2,15	1,86
Umbuzeiro	329 ng/μl	1,91	1,25
Aceroleira	5,6 ng/μl	3,11	-40,89
Cajueiro	87,5 ng/μl	1,85	0,97
Romãzeira	1780,3 ng/μl	0,71	37,16
Romãzeira	3677,2 ng/μl	0,7	-122,76

Fonte: Dados da pesquisa, 2016.

A partir dos dados da Tabela 5 foi possível observar a grande concentração de ácidos nucleicos presente nas amostras, mostrando, dessa forma, que os resultados da eletroforese estavam corretos. 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 260nm e 280nm, onde a razão entre as absorbâncias 260/280nm 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 280nm. Dessa forma, a razão 260/280 estabelece um parâmetro de avaliação da qualidade das amostras de ácidos nucléicos.

5.2.4 Amplificação de fragmentos de DNA por 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 foram bem-sucedidos (Figura 11). Os primers utilizados foram desenhados para anelamento em 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.

DNAs genômicos foram testados em PCR, utilizando combinações de primers (Figura 11). Quando utilizados como molde em reações em cadeia da polimerase com primers específicos para amplificar genes PR-5 completos (PCTP1/PPS1; PCTP2/PPS2; PSS1/PCTP3), somente DNA genômico de 1 espécie vegetal produziu fragmento de tamanho esperado, conforme demonstrado para algumas amostras. O DNA que amplificou com o par de primers PCTP1/PPS1 e PCTP2/PPS2 foi isolado de pinha (*A. squamosa*). As amostras foram aplicadas em gel de agarose para a visualização de amplicons de interesse.

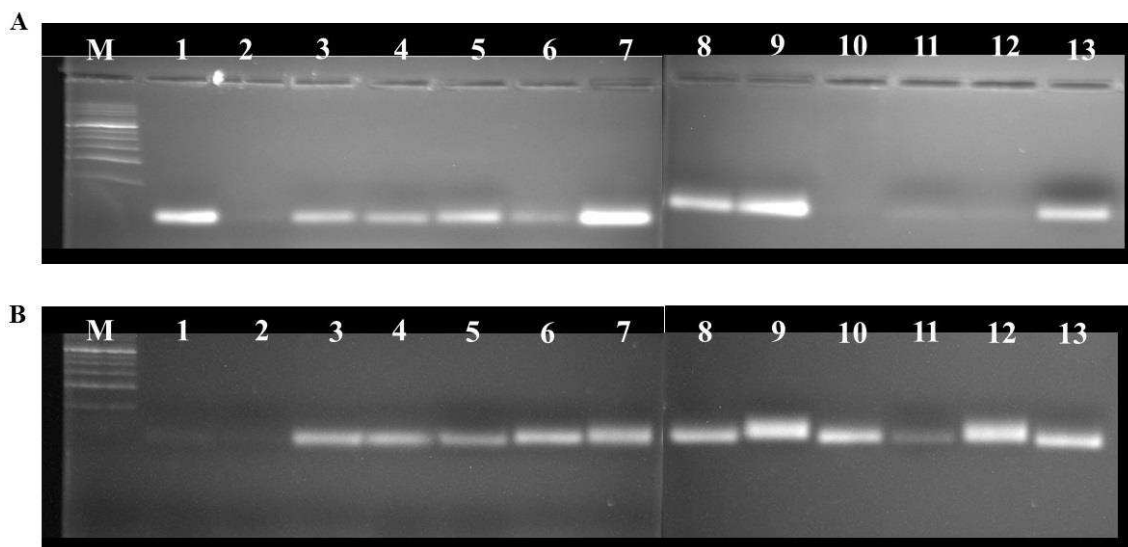
Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% de produtos da PCR utilizando combinações de primers PCTP1/PPS1(1-9) e PCTP2/PPS2(10-18). M.marcador 1-10.pinha; 2-11.goiaba; 3-12.romã; 4-13.cajú; 5 14.umbu; 6-15.mamão; 7-16.acerola; 8-17.DNA de M^a pretinha(controlado positivo); 9-18.água(controlado negativo)



Fonte: Dados da pesquisa, 2015.

Em seguida, uma PCR teste para diferentes combinações de primers para amplificação de fragmentos de genes PR-5 foi realizada com duas plantas que são endêmicas do semiárido paraibano utilizando componentes de PCR do Laboratório de Biotecnologia: enzima, tampão e as seguintes combinações de primers PPS1/PPM2, PPS1/PPM4, PPS1/PPM6, PPS1/PCTP1, PPS1/PCTP2 e PPS1/PCTP3, utilizando como amostra controle o DNA da planta Maria Pretinha. Depois da análise em gel de agarose, observou-se que houve amplificação para as seguintes combinações de primers: PPS1/PPM4, PPS1/PPM6 e PPS1/PCTP3, disponíveis no LBiotec. Os DNAs utilizados foram de Uumbu (*S. tuberosa*) e Caju (*A. occidentale*) obtendo sucesso com os pares de primer PPS1/PPM4 e PPS1/PPM6 para a Região da Proteína Madura (Figura 12A e B).

Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% de produtos da PCR teste para diferentes combinações de primers. **(A)** PPS1/PPM2 (1-4), PPS1/PPM4 (5-8), PPS1/PPM6 (9-13). **(B)** PPS1/PCTP1 (1-4), PPS1/PCTP2 (5-8), PPS1/PCTP3 (9-13) M. marcador, 1. DNA de Maria pretinha (controle positivo), 2. controle negativo (água), 3. umbu 4. caju; 5. controle positivo, 6. controle negativo, 7. umbu, 8. caju; 9. controle positivo, 10. controle negativo, 11-12 umbu, 13. caju.



Fonte: Dados da pesquisa, 2016.

CONCLUSÃO

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

- Com base na prospecção *in silico*, a descoberta de que não existem depósitos de sequências no GenBank/NCBI com os nomes “PR-5”, “thaumatin”, “osmotin” e “pathogenesis-related” *versus* nomes de 06 famílias botânicas ou nomes científicos para 08 fruteiras do semiárido, enquanto que no plantGDB existe apenas uma das família pesquisadas, Caricaceae, referente ao genoma funcional da fruteira mamão (*Carica papaya*) cultivar “SunUP” transgênica, resistente a vírus;
- As sequências PR-5 encontradas no referido genoma, localizadas por palavras-chave “thaumatin” ou “osmotin”, em sua maioria, estão incompletas ou com qualidade inferior, sendo incapaz de identificar genes completos, exceto para um gene que foi denominado de *CpTLP*;
- *CpTLP* codifica uma proteína do tipo taumatina potencialmente ácida, compartilhando características e elevada similaridade de sequência de aminoácidos com outras proteínas PR-5 disponíveis no banco de dados GenBank;
- Um modelo construído para a *CpTLP* madura é significativamente satisfatório e aparentemente funcional, apresentando 8 pontes dissulfeto, formadas por 16 cisteínas conservadas na família PR-5, e sítio ativo visivelmente característico;
- Com base na prospecção *in planta*, a obtenção de DNAs de 4 espécies de fruteiras com qualidade e quantidade suficientes para amplificação por PCR de fragmentos gênicos específicos esperados para genes PR-5.

PERSPECTIVA

Neste trabalho ainda foram realizadas as etapas de eluição dos fragmentos amplificados por PCR (amplicons) do gel de agarose usando o QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN); uma alíquota dos amplicons foi submetida para sequenciamento na Korea (MACROGEN), nos dois sentidos, usando os primers específicos com as quais foram gerados, o restante das amostras foram utilizadas para ligação em vetor de clonagem pGEM-T-Easy (Promega), visando a clonagem molecular dos genes.

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.
- AGRIOS, G. N. Plant pathology 5th Edition: Elsevier Academic Press.**Burlington, Ma. USA**, 2005.
- ALMEIDA, B. et al. Drug-induced apoptosis in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research*, v. 1783, p. 1436–1448, 2008.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology** v.215, p.403-410, 1990.
- ANZLOVAR, S; E DERMASTIA, M. The comparative analysis of osmotins and osmotin-like PR-5 proteins. **Plant Biology**, v.5, p.116–124; 2003.
- ARAÚJO, N. D. A era da bioinformática: seu potencial e suas implicações para as ciências da saúde. **Revista Estudos de Biologia**. v. 30, n. 70/71, 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> Acesso em: 02 de Maio de 2016.
- BECRAFT, P.W. Receptor kinase signaling in plant development. **Annual Review of Cell and Developmental Biology** v. 18, n. 1, p. 163-192 2002.
- BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Para a estimativa da qualidade absoluta de modelos de estrutura de proteínas individuais. **Bioinformática**, v. 27, n. 3, p 343-350, 2011.
- BOL, J. F.; LINTHORST, H. J. M.; CORNELISSEN, B. J. C. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, n. 1, p. 113-138, 1990.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de Plantas**. Viçosa: UFV. 2005. 525p.,
- CAIRES, O. S.; NEVES J. G. C.; FERREIRA E. V. O.; ASSIS R. P. Nutrição mineral, crescimento e níveis críticos foliares de cálcio e magnésio em mudas de umbuzeiro, em função da calagem. **Ceres**, v.55, n.6, 2015.
- CAMPOS, M. A. et al. Putative pathogenesis-related genes within *Solanum nigrum* L. var. *americanum* genome: isolation of two genes coding for PR5-like proteins, phylogenetic and sequence analysis. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 61, n. 4, p. 205-216, 2002.

CAMPOS, M. A.; MONTE, D. C.; GROSSI DE AS, M. F. Mecanismos de moleculares de responsáveis pela resistência em interações planta-patógeno do tipo gene a gene. **Universa**, Brasília, v.8, n.1, p.275-304, 2000.

CAMPOS, M. A. et al. PR gene families of citrus: their organ specific-biotic and abiotic inducible expression. Profiles based on ESTs approach. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 3, p. 917-930, 2007.

ELKEREMY, 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.

FERREIRA, R.B; MONTEIRO, S; FREITAS, R; SANTOS, C.N; CHEN, Z; BATISTA, L.M; DUARTE, J; BORGES, A; TEIXEIRA, A.R; The role of plant defense proteins in fungal pathogenesis, **Molecular Plant Pathology**, v. 8, n. 5, p, 677–700; 8 2007.

FILHO, F. A. A. M.; STIPP, L. C. L.; MENDES, B. M. J. Perspectivas da Produção e Utilização de Transgênicos para o controle do *huanglongbing*. **Citrus Research and Technology**, Cordeirópolis, v.31, n.1, p.91-100, 2010.

FILS-LYCANON, B.R; WIERSMA, P.A; EASTWELL, K.C; SAUTIERE, P. A cherry protein and its gene, abundantly expressed in ripening fruit, have been identified as thaumatin-like. **Plant Physiology**, v. 111, p.269–273, 1996.

GASTEIGER E., HOOGLAND C., GATTIKER A., DUVAUD S., WILKINS M.R., APPEL R.D., BAIROCH A. **Protein identification and analysis tools on the expasy server**; (In) John M.Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press 2005.pp. 571-607.

GOFF, K.E.; RAMONELL, K.M. The role and regulation of receptor-like kinases in plant defense. **Gene Regulation and Systems Biology**, v. 1, p. 167 2007.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Dinamica molecular visualis. **Journal of Molecular Graphics**. v. 14, n, p. 33-8, 27-8, 1996

IGLESIAS, V.A.; MEINS JR., F. Movement of plant viruse is delayed in a β -1,3-glucanase-deficient mutant showing a reduced plasmodesmatal size exclusion limit and enhanced callose deposition. **The Plant Journal**. v. 21, n. 2, p. 157-166, 2000.

JUNG Y.C. et al. Drought-inducible-but ABA-independent-thaumatin-like protein from carrot (*Daucus carota* L.). **Plant Cell Reports**, v. 24, n.6, p. 366-373, 2005.

KAWABATA, T. Detection of multi-scale pockets on protein surfaces using mathematical morphology. **Proteins**, v.78, p.1195-1121, 2010.

KUMAR. S A; KUMARI. P. H; KUMAR. G. S. MOHANALATHAC KISHOR.P.B.K (2015). Osmotin: a plant sentinela and a possibli agonist of mammalian adiponectin – **Frontiers in Plant Science**, v.6, 2015.

KUBOYAMA, T; YOOSHIDA, K.T; TAKEDA, G. An acidic 39-kDa protein secreted from stigmas of tobacco has an amino-terminal motif that is conserved among thaumatin-like proteins. **Plant Cell Physiology** 38:91–95; 1997.

JAMI, S. K; ANURADHA, T. S; GURUPRASAD, L., E KIRTI, P. B. Molecular, biochemical and structural characterization of osmotin-like protein from black nightshade (*Solanum nigrum*). **Journal of Plant Physiology**, v.164, p.238–252; 2007.

LASKOWSKI, R.A.; MACARTHUR. M. W; MOSS, D.; THORNTON, J. M. PROCHECK. Um programa para verificar a qualidade estereoquímica de estruturaa de proteínas. **Journal Applied Crystallography**, v.26, p.283-291, 1993.

LINTHOTST H. J. M., VAN LOON L. C. Pathogenesis-related proteins of plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v. 10, n. 2, p. 123-150, 1991.

LOOZEA, Y.; BOUSSARDA, P.; HUETA, J.; VANDENBUSSCHEB, G.; RAUSSENSB.; WINTJENS, R. Purification and characterization of a wound-inducible thaumatin-like protein from the latex of *Carica papaya*. **Phytochemistry**, Elsevier, v.70, n. 8, p. 970-978, 2009.

MALEHORN D. E., BORGMEYER J. R., SMITH C. E., SHAH D. M. (1994). Characterization and expression of an antifungal zeamatin-like protein (Zlp) gene from *Zea mays*. **Plant Physiology** v. 106, n. 4, p. 1471-1481, 1994

MING, R.; HOU, S.; FENG, Y.; YU, Q.; DIONNE-LAPORTE, A.; SAW, J. H.; SALZBERG, S. L. The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). **Nature**, v. 452, n.7190, p.991-996. 2008.

MORENO, F.B.M.B.; OLIVEIRA, R.S.B.; AZEVEDO M. R.; LOBO, M.D.P., FREITAS, C.D.T.; RAMOS, M.V.; GRANGEIRO, T.B.; MONTEIRO M, A.C.O. Crystal Structure of an antifungal laticifer protein. Publicado apenas no Protein Data Bank. Disponível em <<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4L2J>> acesso em 26 de abril de 2016.

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

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.

OGATA C. M., GORDON P. F., deVOS A. M., Kim S. H. (1992). Crystal structure of a sweet tasting protein thaumatin I, at 1.65 Å Resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 228, n. 3, p. 893-908, 1992.

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.

OUCHI, J. Induction of Resistance or Susceptibility. **Annual Review of Phytopathology** v. 21, n. 1, p. 289-315 1983.

PEREIRA, L. M. Expressão quantitativa de genes relacionados à defesa induzida em theobroma cacao por bion e agro-mos contra *Crinipellis pernicioso*. 2014.

PATADE V. Y., KHATRI D., MANOJ K., KUMARI M., AHMED Z. Cold tolerance in thiourea primed *Capsicum* seedlings is associated with transcript regulation of stress responsive genes. **Molecular biology reports**, v. 39, n. 12, p. 10603-10613, 2012.

PETRE. B; MAJOR. I; ROUHIER.N; DUPLESSIS. S- Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar. **BMC Plant Biology**. v. 11, n. 1, p. 33, 2011

PETERSEN, T. N., BRUNA k. S., VON, H. G. & NIELSEN H. discriminating signal peptides from transmembrane regions **Nature Methods**. v. 8, n. 10, p. 785-786, 2011.

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.

VAN LOON, L.C.; PIERPOINT, W.S.; BOLLER, T.; CONEJERO, V. Recommendations for Naming Plant Pathogenesis-Related Proteins. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 12, n. 3, p. 245-264 1994.

VELAZHAHAN, R., DATTA, SK., MUTHUKRISHNAN, S. The PR-5 family: thaumatin-like proteins. In: Datta SK, Muthukrishnan S, editors. **Pathogenesis-related proteins in plants**. Boca Raton: CRC Press; 1999. p. 107 –29.

WEBER, R. L. M et al. Expression of an osmotin-like protein from *Solanum nigrum* confers drought tolerance in transgenic soybean. **BMC plant biology**, v. 14, n. 1, p. 1, 2014.

SANTOS, C. M.; ABREU, C. M. P. Caracterização e utilização de subproduto do mamão (*Carica papaya l.*) **Universidade Federal de Lavras**, 2015. Disponível em <<http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/10284>> acesso em 18 de abril de 2016.

SHARMA, P et al. Allergenicity assessment of osmotin, a pathogenesis-related protein, used for transgenic crops. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 18, p. 9990-9995, 2011.

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

SILVA, C. E. F.; MOURA, E. M. O.; ANDRADE, F. P.; GOIS, G. N. S. B.; SILVA, I. C. C.; SILVA, L. M. O.; SOUZA, J. E. A.; ABUD, A. K. S. The Importance of Monitoring the Identity and Quality Standards in Fruit Pulp Industry. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v.3, n.1, 2016.

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

SINGH, N. K.; HANDA, A. K.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. Proteínas associadas com a adaptação de células de tabaco cultivadas com NaCl. **Plant Physiol**, p.79.1.126, 1985.

SUBRAMANYAM, K; SAILAJA, K.V; SUBRAMANYAN, K; RAO, D. M; LAKSHMIDEVI, K. Ectopic expression of an osmotin gene leads to enhanced salt tolerance in transgenic chilli pepper *Capsicum annum L.* **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 105, p.181–192, 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 Reports**, V. 23, p.811-818, 2005.

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

ZEMANEK E., WASSERMAN B. P. Issues and advances on the use of transgenic organisms for the production of thaumatin, the intensely sweet protein from *Thaumatococcus daniellii* **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 35, n. 5, p. 455-466, 1995.