

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS  
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

ESTUDO *IN SILICO* DOS DIFERENTES GRUPOS DE FOSFOLIPASE PRESENTES NO  
TRANSCRIPTOMA DE *Urochloa decumbens* (Stapf) cv. *Basilisk*

BRUNA SANTI BANDEIRA

DOURADOS, MS

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS  
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

ESTUDO *IN SILICO* DOS DIFERENTES GRUPOS DE FOSFOLIPASE PRESENTES NO  
TRANSCRIPTOMA DE *Urochloa decumbens* (Stapf) cv. *Basilisk*

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Bacharel em  
Biotecnologia, no Curso de Graduação em  
Biotecnologia da Universidade Federal da  
Grande Dourados.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira

DOURADOS, MS

2017

BRUNA SANTI BANDEIRA

ESTUDO *IN SILICO* DOS DIFERENTES GRUPOS DE FOSFOLIPASE PRESENTES NO  
TRANSCRIPTOMA DE *Urochloa decumbens* (Stapf) cv. *Basilisk*

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira  
Universidade Federal da Grande Dourados  
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais

---

Profa. Dra. Lorena Pastorini Donini  
Universidade Federal da Grande Dourados  
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais

---

Profa. Dra. Liliam Silvia Candido  
Universidade Federal da Grande Dourados  
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira, pela paciência, suporte e pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

A minha coordenadora Profa. Dra. Cláudia Roberta Damiani, pelo apoio incondicional.

Agradeço também a Dra. Lucimara Chiari e a sua equipe da EMBRAPA Gado de Corte de Campo Grande, MS, por fornecerem os dados que possibilitaram esse trabalho.

Agradeço aos meus pais Oltamir e Márcia e minhas irmãs Isabella e Eduarda pelo amor, incentivo e por não me deixarem desistir.

Aos meus tios Fernando e Wanessa, nunca vou esquecer o que fizeram por mim.

Agradeço também aos meus amigos que participaram da minha vida acadêmica, principalmente a Ana Carolina e ao Robison pela força para a conclusão deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>6</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE ABREVIACÕES .....</b>	<b>8</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>10</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
1.1 Objetivos .....	12
1.2 Justificativa .....	12
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>12</b>
2.1. <i>Urochloa decumbens</i> .....	12
2.2. Fosfolipases vegetais.....	15
2.2.1. Fosfolipase A1 .....	16
2.2.2. Fosfolipase A2 .....	16
2.2.3 Fosfolipases B .....	18
2.2.4. Fosfolipase C.....	19
2.2.5. Fosfolipases D .....	20
2.3 Transcriptômica .....	22
2.4 Filogenia.....	24
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
3.1 Material biológico e extração de RNA para o sequenciamento. ....	25
3.2 Construção das bibliotecas de mRNA .....	26
3.3 Obtenção das sequências de fosfolipases do banco de dados.....	26
3.4 Construção das árvores filogenéticas .....	27
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>27</b>
4.1 Resultados do alinhamento local feito pelo Blast .....	27
4.2 Análise filogenética da PLA1 .....	33
4.3 Análise filogenética da PLA2 .....	34
4.4 Análise filogenética da PLC .....	35
4.5 Análise filogenética da PLD .....	36
<b>6.REFERÊNCIAS .....</b>	<b>37</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Urochloa decumbens</i> (Stapf) cv. <i>Basilisk</i> .....	13
<b>Figura 2.</b> Ramos da <i>U. decumbens</i> .....	14
<b>Figura 3.</b> Estrutura química do fosfolípido.....	15
<b>Figura 4.</b> O modo de hidrólise de fosfolípidios por PLB. .....	18
<b>Figura 5.</b> Árvore filogenética com sequências de <i>Urochloa decumbens</i> e fosfolipase A1.....	32
<b>Figura 6.</b> Árvore filogenética com sequências de <i>Urochloa decumbens</i> e fosfolipase A2.....	33
<b>Figura 7.</b> Árvore filogenética de sequências de <i>Urochloa decumbens</i> e fosfolipase C.....	34
<b>Figura 8.</b> Árvore filogenética de sequências de <i>Urochloa decumbens</i> e fosfolipase D.....	35

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Sequências de fosfolipase A1 com as suas respectivas sequências mais similares do banco de dados do NCBI.....	27
<b>Tabela 2.</b> Sequências de fosfolipase A2 com as suas respectivas sequências mais similares do banco de dados do NCBI.....	28
<b>Tabela 3.</b> Sequências de fosfolipase C com as suas respectivas sequências mais similares do banco de dados do NCBI.....	29
<b>Tabela 4.</b> Sequências de fosfolipase D com as suas respectivas sequências mais similares do banco de dados do NCBI.....	30

## LISTA DE ABREVIACÕES

BGI: Beijing Genomics Institute

Blast: Basic Local Alignment Search Tool

Blastn: Nucleotide BLAST

cDNA: Complementary DNA

DAG: Diacilglicerol

DNA: Deoxyribonucleic acid

FCBA: Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais

E-value: Expectation value

GenBank: National Center for Biotechnology Information

GPI – PLCs: Glicosilfosfatidilinositol

GI: Número de identificao da sequência no banco de dados do NCBI

IDENT: Quantidade de pareamentos corretos

MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis

mRNA: Messenger RNA

NCBI: National Center for Biotechnology Information

PA: cido fosftido

PC: Fosfolipase A1

PLA1: Fosfolipase tipo A1

PLA2: Fosfolipase tipo A2

PLB: Fosfolipase B

PLC: Fosfolipase C

PLD: Fosfolipase D

RNA: ribonucleic acid

TIM: Triose fosfato isomerase

*TOTAL SCORE: Número de pontos similares entre a sequência da planta e do banco de dados*

*U. decumbens: Urochloa decumbens*

## RESUMO

A *Urochloa decumbens* (Stapf) cv. *Basilisk* (*U. decumbens*) é considerada uma excelente forrageira, resistente a seca e se desenvolve nos mais diversos tipos de solos; assim possui grande importância para a produção de ruminantes, já que no Brasil as pastagens representam o principal e mais econômico recurso alimentar para a pecuária. Para estudar mais esta espécie, seu RNA foi extraído nas instalações da Embrapa Gado de Corte de Campo Grande-MS, e sequenciado pelo Beijing Genomics Institute na China. A partir desse sequenciamento foram encontrados um conjunto de genes que codificam as fosfolipases, que são enzimas envolvidas na sinalização e imunidade das plantas e que são divididas em fosfolipase A1 (PLA1), fosfolipase A2(PLA2), fosfolipase B(PLB), fosfolipase C(PLC) e fosfolipase D(PLD). A PLB foi o único grupo não encontrado na *U. decumbens*. A partir deste sequenciamento foram realizados Blastn e análises filogenéticas para verificar a similaridade destas sequências com outras fosfolipases de diferentes plantas. Este foi um estudo inédito e após análises observou-se que PLA1 e PLA2 possuem grande homologia com o painço (*Setaria italica*), PLA2 e PLD além da *Setaria italica* apresentaram alta homologia com o braquipódio (*Brachypodium distachyon*) e com o milho (*Zea mays*) respectivamente. O estudo de novas cultivares, e do melhoramento dos cultivares já existentes é e será sempre necessário para a manutenção da qualidade das áreas de pastagem no Brasil

**Palavras-chave:** brachiaria, enzima, filogenia.

## ABSTRACT

*Urochloa decumbens* (Stapf) cv. *Basilisk* (*U. decumbens*) is considered as an excellent forage, resistant to drought and grows in the most diverse types of soils; so it has great importance for the production of ruminants, since in Brazil the pastures represent the main and most economic resource for livestock. To further study the plant, its RNA was extracted by Embrapa Cattle from Campo Grande-MS, and sequenced by the Beijing Genomics Institute in China. From this sequencing we found a set of genes coding for phospholipases, enzymes involved in plant signaling and immunity, and which are divided into phospholipase A1(PLA1), phospholipase A2(PLA2), phospholipase B(PLB), phospholipase C (PLC) and phospholipase D (PLD). PLB was the only non- Found in *U. decumbens*. From this sequencing Blastn and phylogenetic analyzes were performed to verify the similarity of these sequences with other phospholipases from different plants. This was an unpublished study and after analysis, it was observed that PLA1 and PLA2 have great similarity with millet (*Setaria italica*), PLA2 and PLD besides *Setaria italica* presented high similarity with braquiária (*Brachypodium distachyon*) and corn (*Zea mays*) respectively. The study of new cultivars, and the improvement of existing cultivars is and will always be necessary to maintain the quality of grazing areas in Brazil

**Key words:** brachiaria, enzyme, phylogeny.

## 1. INTRODUÇÃO

Os países tropicais e subtropicais representam aproximadamente metade da produção mundial de gado bovino (JANK et al., 2011). No Brasil são utilizados 172 milhões de hectares de pastagens para alimentar 215,20 milhões de bovinos (IBGE 2015).

As pastagens no Brasil, representam os recursos alimentares mais econômicos para a produção de ruminantes, nesse caso as pastagens tropicais, sabendo-se que não existe outro tipo de modalidade alimentar que seja mais competitiva que a forragem colhida no campo pelo próprio animal. Assim, um fator de suma importância que contribui para o aumento dessas pastagens e da produção animal no país, foi a inserção das pastagens cultivadas principalmente de origem africana, denominadas forrageiras pertencentes ao gênero *Brachiaria* (VALLE et al., 2010).

Apesar da boa adaptação às regiões de savana do Brasil e a alta importância econômica de *U. decumbens* para a produção animal em muitos países tropicais, os dados genômicos sobre as espécies são limitados, por isso expandir o conhecimento sobre esta espécie pode levar a eficientes programas de criação de animais. (SALGADO et al., 2017)

A importância do gênero é aumentada pela adaptabilidade que essas espécies apresentam a vários tipos de solos e, principalmente, pela resistência à cigarrinha-das pastagens (VALLE et al., 2010).

Nesse sentido uma das espécies é a *U. decumbens*, que constitui-se como excelente forrageira, perene, com grande produção de massa foliar, resiste ao pastejo e ao pisoteio, protege, portanto, o solo contra a erosão. Nos locais onde essa espécie foi posta como forrageira, ao se transformar essas terras em lavouras, o capim-braquiária passará a ser um importante infestante, e de controle dificultoso. A *U. decumbens*, resiste a seca, adapta-se as regiões tropicais e úmidas, não é muito tolerante ao frio e cresce nos mais diversos tipos de solo, contudo necessita de boa drenagem (PEREIRA et al., 2012).

A espécie *U. decumbens* é bastante resistente a secas e adaptada a regiões tropicais úmidas como a Amazônia Legal. Cresce bem em diversos tipos de solos como arenosos e argilosos, podendo ser trabalhada em solos com baixa ou média fertilidade. Porém, responde bem quando em solos adubados (SILVA & FERRARI, 2012).

As fosfolipases estão envolvidas na sinalização e imunidade das plantas durante interações planta-patógeno. Após a infestação de micróbios, as enzimas hidrolizantes de

fosfolípidos são ativadas, contribuindo para o estabelecimento de uma resposta adequada à defesa induzindo a produção de moléculas de sinalização de defesa (SIEBERS et al., 2016).

## 1.1 Objetivos

Geral: Verificar a presença de genes que codificam a fosfolipase a partir do transcriptoma da *Urochloa decumbens* cv *Basilisk*.

Específicos:

1. Fazer uma avaliação da similaridade das fosfolipases presentes no transcriptoma de *U. decumbens* com as encontradas no banco de dados biológicos genbank do NCBI.
2. Realizar análise filogenética entre as fosfolipases encontradas.

## 1.2 Justificativa

Este é um trabalho inédito, pois foi o primeiro que forneceu informações sobre evolução das sequências de fosfolipase no transcriptoma da *Urochloa decumbens* (Stapf) cv. *Basilisk*, e auxiliará em futuros trabalhos de melhoramento genético.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. *Urochloa decumbens*

A atual classificação taxonômica de *U. decumbens* é:

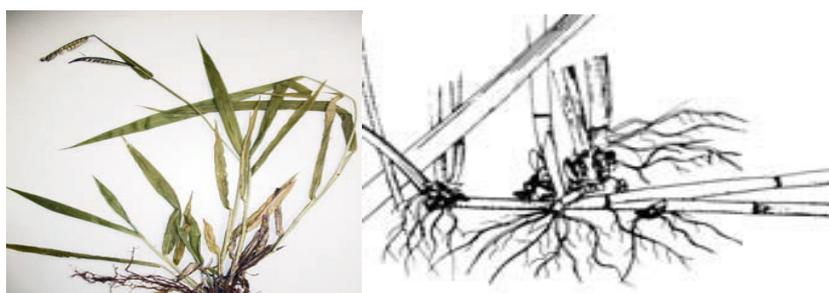
Reino: *Plantae*; Divisão: *Angiospermae*; Família: *Poaceae*; Subfamília: *Panicoidae*; Gênero: *Urochloa*; Espécie: *Urochloa decumbens* (Shirasuna, 2015).

Gramínea de hábito decumbente, bastante enfolhada, formando denso relvado de até 100cm de altura. Folhas muito pubescentes e inflorescência racimosas contendo racemos com

fila dupla de sementes (Figura 2), ráquulas em ziguezague e finas. As plantas são robustas, geniculada em alguns nós inferiores e pouco radicante. Os rizomas apresentam-se na forma de pequenos nódulos e emitem grande quantidade de estolões, bem enraizados e com pontos de crescimento protegidos (rizomas e gemas axilares) (FIGUEIRAS,2012).

As espécies do gênero *Urochloa* foram trazidas para América da África e foram amplamente utilizados em pastagens para pastoreio de gado, especialmente *U. decumbens* e *U. brizantha*, que tem mostrado ampla adaptação e são amplamente utilizados como pastagens no ecossistema (VALLE et al., 2010). *U. decumbens* ganhou especial atenção devido à sua alta produtividade sob uso intensivo, crescimento vigoroso, facilidade de estabelecimento e boa forragem valor ao longo do ano, bem como sua adaptação excepcional para solos ácidos inférteis, que é principalmente devido à sua alta tolerância ao Alumínio (SALGADO et al, 2017).

A *U. decumbens*, constitui-se como excelente forrageira, perene, com grande produção de massa foliar, resiste ao pastejo e ao pisoteio, protege, portanto o solo contra a erosão. Nos locais onde essa espécie foi posta como forrageira, ao se transformar essas terras em lavouras, o capim-braquiária passará a ser um importante infestante, e de controle dificultoso. A *U. decumbens* (Figura 1), resiste a seca, adapta-se as regiões tropicais e úmidas, não é muito tolerante ao frio e cresce nos mais diversos tipos de solo, contudo necessita de boa drenagem (PEREIRA et al., 2012).



**Figura 1:** *U. decumbens*, é um cultivar com hábito em touceira, com ramo delgado (FIGUEIRAS, 2012).



**Figura 2:** Os ramos possuem largura de 2-4mm, disposição das espiguetas ao longo dos ramos da inflorescência será sempre duplas (FIGUEIRAS, 2012).

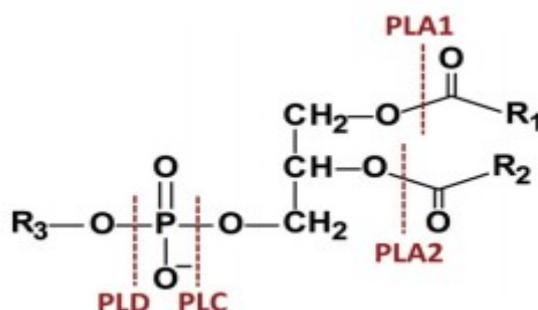
Sabe-se que a *U. decumbens* se não for manejada corretamente pode se transformar em uma espécie daninha ocasionando prejuízos as lavouras (PEREIRA et al., 2012). Jakelaitis et al. (2004) concordam que apesar da *U. decumbens*, apresentar excelente adaptação a solos de baixa fertilidade, fácil estabelecimento e produção de biomassa no decorrer do ano, proporciona ótima cobertura vegetal do solo, em virtude de sua agressividade e resistência, é também uma espécie daninha da maioria das culturas anuais e perenes. “*U. decumbens* pode ser considerada importante espécie de planta daninha em lavouras de soja da região Centro-Oeste, em áreas de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, com ocorrência também nas mais diversas culturas.” A integração entre agricultura e pecuária pode ser constituída de distintas formas, por isso o consórcio entre a cultura de grãos e a espécie forrageira traz uma dessas possibilidades e para esse sistema de cultivo tem-se o gênero *Urochloa*, dentre eles a *U. decumbens* que em consórcios de culturas anuais de grãos, pode-se estabelecer uma vantagem competitiva as culturas anuais ao efetuar a semeadura das gramíneas forrageiras em maior profundidade do solo (IKEDA et al., 2013).

O estudo de novas cultivares, e do melhoramento dos cultivares já existentes é e será sempre necessário para a manutenção da qualidade das áreas de pastagem no Brasil, os programas de pesquisa buscam boa produção por hectare, adaptabilidade a clima e solo, um sistema sustentável por longo tempo, alto valor nutricional, resistência a estresses bióticos e abióticos, produção de sementes de boa qualidade, e um bom pastejo em condições gerais, que assegure a transformação vegetal em proteína animal de alto valor (PEREIRA et al., 2012).

## 2.2. Fosfolipases vegetais

Dentre as enzimas que apresentam o fenômeno de catalise interfacial, têm-se as fosfolipases, uma grande família de enterases, que objetivam a hidrólise de glicerofosfolípídios e atividade catalítica. As fosfolipases foram divididas em cinco categorias (Figura 3): PLA1, PLA2, PLB, PLC e PLD (SAITO, 2014).

As fosfolipases estão envolvidas na sinalização e imunidade das plantas durante interações planta-patógeno. Catalisam a conversão de fosfolípideos em ácidos graxos e lisofosfolípideos, diacilglicerol, dependendo da sua especificidade de posição. Após a infestação de micróbios, as enzimas hidrolizantes de fosfolípideos são ativadas, contribuindo para o estabelecimento de uma resposta adequada à defesa induzindo a produção de moléculas de sinalização de defesa (SIEBERS et al., 2016).



**Figura 3.** Estrutura química do fosfolípido. As fosfolipases PLD, PLC e PLA clivam os fosfolípídios em diferentes locais, como indicado por linhas tracejadas (SIEBERS et al., 2016)

As Fosfolipases A1, apresentam a hidrólise de ligações na posição Sn-1 de fosfolípídios, cuja reação resulta na formação de 2-acilfosfolípídios e de ácidos graxos livres. Já a fosfolipase A2 catalisam a hidrólise da posição Sn-2 de glicerofosfolípídios de membrana, produzem 1-acilfosfolípídios e ácidos graxos livres. Esta reação é particularmente importante quando o ácido graxo gerando o ácido araquidônico. Fosfolipases B por sua vez clivam as ligações sn-1 e sn-2 de glicerofosfolípídios, exerce ação fosfolipídica e lisofosfolipídica. A fosfolipase C, são importantes no metabolismo dos fosfolípídios

inositolícos e as fosfolipases D, objetivam realizar a hidrólise de glicerofosfolipídios (OLIVEIRA, 2006).

As fosfolipases liberam moléculas que podem atuar como mensageiros (DAG, e IP<sub>3</sub>, por exemplo) ou outro substrato para a síntese de mensageiros (por exemplo, ácido araquidônico), responsáveis não somente por degradação de fosfolipídios mais ainda o remodelamento, ou seja, a fosfolipase A1 e A2 removem ácidos graxos específicos de membrana que podem ser substituídos por ácidos graxos alternativos por ação de acil-CoA-transferase (HARVEY & FERRIER, 2012).

### **2.2.1. Fosfolipase A1**

A superfamília da fosfolipase A (PLA) é dividida em PLA1 e PLA2. As PLAs estão envolvidas na regulação do crescimento da planta, raiz e desenvolvimento do pólen, respostas ao estresse e sinalização de defesa. As enzimas PLA1 catalisam a hidrólise das ligações de ésteres de acilo de fosfolípidos nas posições sn-1 produzindo ácidos graxos livres e lisofosfolípeos. (SIEBERS et al., 2016)

A fosfolipase A1 (PLA1) é bem distribuída em vários tecidos e organismos, apresenta função fisiológica na hidrólise de glicerofosfolípeos, ainda possui grande interesse industrial, em virtude da produção de 2-acilfosfolípeos de elevado valor comercial. Os lisofosfolípeos resultantes da ação da PLA1 possuem propriedades emulsificantes e desempenham importância para indústria de alimentos, de cosméticos e farmacêuticos (PEREIRA, 2012).

### **2.2.2. Fosfolipase A2**

As fosfolipases A2 dividem-se em Ca<sup>2+</sup> dependentes-PLA2 secretórias (SPLA2), citosólicas (cPLA2), acetilhidrolases fator de agregação plaquetária (PAF-AH) e as lisossômicas e as Ca<sup>2+</sup> independentes. Todas dividem-se conforme o mecanismo catalítico e suas características funcionais e estruturais. As PLA2 secretórias dividem-se em 14 grupos, conforme o número de resíduos de aminoácidos e posição das ligações dissulfeto (SANTOS & FILHO, 2012).

As fosfolipases A2 catalisam a hidrólise da posição sn-2 dos glicerofosfolipídios de membrana, produzindo 1- acilfosfolipídios e ácidos graxos livres. Quando o ácido graxo

gerado é o ácido araquidônico, representa importante reação, já que este é convertido por enzimas metabólicas em vários compostos bioativos, como as prostaglandinas e os leucotrienos. Outros produtos da reação, como por exemplo, o ácido lisofosfatídico e a lisofosfatidilcolina também são importantes compostos reativos, sendo precursores de outros mediadores bioativos tais como o fator de ativação plaquetária (PAF). Estudos indicam que a PLA2 também possui função na apoptose e homeostasia de  $Ca^{2+}$  (SANTOS & FILHO, 2012).

Fosfolipases potencialmente envolvidas na transdução de plantas têm sido muito estudadas. Na pesquisa realizada para avaliar a resposta de defesa da *Ricinus communis* (mamona) contra predadores, observaram as atividades de PLA2, nos extratos das folhas da planta, submetidas à injúria mecânica. Constataram que os métodos utilizados, é uma ferramenta eficaz para obter PLA2 a partir de outras fontes e aumentar a compreensão do sistema de processamento de informação intracelular, a transcrição de genes de defesa e os papéis funcionais das fosfolipases específica em plantas mamona. Ainda pode-se dizer que estas informações poderão ser úteis para modular a expressão de proteínas alvo em plantas transgênicas a fim de aumentar a sua resistência ao ataque de pragas no campo (DOMINGUES et al., 2007).

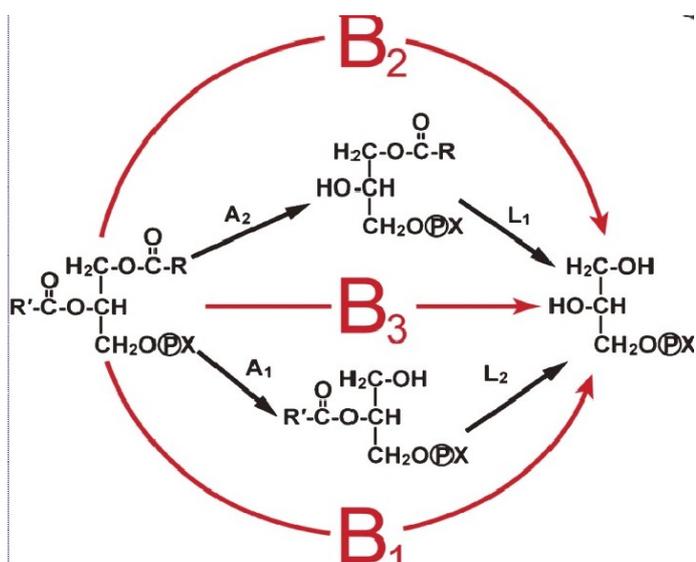
Nas mudas de *Papaver somniferum L.* (papoula dormideira), foi encontrada uma sequência completa de uma nova fosfolipase A2, o DNAC de papoula fosfolipase A2, denominado pspla2, com codificação de 159 aminoácidos com peptídeo em cadeia com 31 aminoácidos na extremidade N-terminal de uma proteína, a psPLA2 (JABLONICKÁ et al., 2016).

A *Andrographis paniculata* (Rei de bitters), é uma planta muito utilizada na medicina chinesa para inibir processos anti-inflamatórios. Porém as anti-inflamatórias, atividades da fosfolipase A2 (PLA2) não estão bem esclarecidas. No estudo realizado a partir do extrato etanólico da *A. paniculata*, os pesquisadores induziram ratos Wistar albinos a terem edemas e injetaram 0,5ug/ml, do extrato etanólico desta planta, os resultados demonstraram que a mesma reduziu significativamente o edema, o que justifica estudos adicionais a fim de desenvolver um composto bioativo a partir do extrato etanólico dessa planta (KISRORE et al., 2016).

### 2.2.3 Fosfolipases B

A terminologia fosfolipase B foi descrita pela primeira vez em 1933, por Contardi e Ercoli como lecitinase, que atacava uma ligação de éster de acil de lisolecitina, ou seja, a lisolecitina foi enzimaticamente derivada da lecitina por lecitase A, a única conhecida até aquele momento e sucessivamente a lecitase B. A fonte de enzima utilizada foi o farelo de arroz. Desse modo a fosfolipase do mesmo tinha duas atividades, lisofosfolipase e atividade fosfolipase, desse modo o termo fosfolipase B caiu em desuso, na verdade as fosfolipases foram divididas em cinco seções: PLA1, PLA2, PLB, PLC e PLD (SAITO, 2014).

Diferente do PLA2, a PLB catalisa a desacilação das ligações de esterótipos de sn-1 e sn-2 de diacilfosfolípidos. Três maneiras são pensadas sucessivamente, como pode ser observado na figura 4: 1) De sn-2 para sn-1, 2) de sn-1 para sn-2 e 3) simultaneamente, ambas as ligações sn-1 e sn-2. Eles poderiam ser nomeados PLB2, PLB1 e PLB3, respectivamente (SAITO, 2014).



**Figura 4.** O modo de hidrólise de diacilfosfolípidos por PLB. B1, B2 e B3 = fosfolipase Bs (SAITO,2014).

As fosfolipases B podem realizar a clivagem das ligações Sn-1 e Sn-2 de glicerofosfolípidos, apresenta ação fosfolipídica e lisofosfolipídica. Em fungos há atividade tipo fosfolipase-transacilase dessa enzima. Assim considerada como fator de virulência para organismos patogênicos. Logo a PLB apresenta três atividades enzimáticas: fosfolipídica,

lisofosfolipídica e transacídica em uma única proteína (PEREIRA, 2012).

#### 2.2.4. Fosfolipase C

As fosfolipases C compõem-se por uma família fosfodiesterases, importantes no metabolismo de fosfolipídios inositólicos, que possuem como substrato fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, dando origem a dois produtos intracelulares: inositol 1,4,5-trifosfato (mensageiro mobilizador de cálcio e diacilglicerol (DAG) e um ativador da quinase C. “As fosfolipases C desempenham papel no mecanismo de sinalização celular em mamíferos e apresentam função reconhecida na ação de muitos hormônios, neurotransmissores e fatores de crescimento” (PEREIRA, 2012).

Enzimas PLC são conhecidas por atuar como importantes componentes de sinalização ao controlar as oscilações de Cálcio. A ativação rápida de enzimas de fosfolipase C ocorre logo após a estimulação de imuno-receptores de plantas (AHMED et al., 2016).

O grupo de fosfolipases C (PLC) em plantas pode ser dividido em três famílias de acordo com a especificidade do substrato e função celular: PLCs não específicos, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato; PLCs (PI-PLC) que agem sobre fosfoinositídeos e é estimulada em plantas em resposta à infecção patogênica; e glicosilfosfatidilinositol (GPI-PLCs) que hidrolizam âncoras GPI em proteínas (SIEBERS et al., 2016).

As enzimas são de seis classes, diferentes de animais e desempenham um papel importante na sinalização intracelular por hidrólise de lipídios de inositol em membranas celulares, e uma enzima PLC típica contém um domínio de mão EF N-terminal que está envolvido na ligação de cálcio. Este domínio é seguido pela X catalítica domínios que são conhecidos por formar em conjunto uma estrutura em cilindro distorcida triose fosfato isomerase (TIM), contendo os resíduos do local ativo (PLCXc) e Y (PLCYc). Além disso, os CLPs têm um domínio C2, que está localizado na extremidade C-terminal. Este domínio verificou-se ser crucial para a atividade enzimática (AHMED et al., 2016).

Arakawa em 2009 descreve que a ativação da proteína G ativa a fosfolipase C (PLC), uma enzima ligada à membrana, que hidrolisa um fosfolipídio da membrana (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato) PIP<sub>2</sub>, ao qual gera dois mensageiros secundários; inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) e o lipídio diacilglicerol (DAG), a descoberta do papel dos mensageiros IP<sub>3</sub> e DAG, trouxe conhecimento da sinalização pelos fosfoinositídeos. Portanto as

fosfolipases C são consideradas fundamentais reguladores nos processos celulares. Cinco genes PLCs fosfoinositídeos- específica foram identificados em três espécies de fungos filamentosos, por exemplo, *Aspergillus nidulans*. Nos eucariotos superiores fosfolipases C (PI-PLCs) fosfatidilinositol-específicas são importantes na patogenia do câncer, regulação e ação de diversos fatores de crescimento da oncogênese envolvidas na proliferação de células.

Alvarenga et al. (2014) complementam que o  $Ca^{2+}$  nuclear tem um papel importante na terapêutica do câncer, desse modo a ligação do  $Ca^{2+}$  intracelular com o receptor localizado na membrana das células. Essa ligação poderá promover a ativação da fosfolipase C, ao qual gerará inositol-1,4,5-trifosfato (IP3), onde será difundido para o interior celular liberando  $Ca^{2+}$  dos estoques internos, através da ativação do canal  $Ca^{2+}$ , por exemplo, do receptor de inositol-1,4,5-trifosfato (IP3R), presente na membrana das organelas armazenadoras de  $Ca^{2+}$ , o que poderá favorecer na diminuição da colonização de células tumorais.

Mikami (2014) destacam que foram Hirayama et al., que apresentaram o primeiro registro do gene PI-PLC em plantas. Desde então as informações sobre gene PI-PLC de plantas terrestres e algas verdes tem acumulado a partir de resultados de clonagem molecular e análise in silico com base em sequência de dados do genoma.

Suh et al., (2008) destacam que a fosfolipase C é uma molécula efetuidora no processo de transdução de sinal. Ela gera mensageiro, inositol-1,4,5-trifosfato e diacilglicerol de fosfatidil inositol 4,5-bifosfato.

### **2.2.5. Fosfolipases D**

Hanahan e Chaikoff descreveram em 1947 as fosfolipases D, em extratos de cenoura. As mesmas encontraram-se em diversos organismos como bactérias, vírus, fungos, plantas e animais. Em mamíferos encontram-se na maioria das células, possui atividade regulatória sobre o citoesqueleto, estão envolvidas nos processos de sinalização celular e no tráfego vesicular coligado a secreção e a endocitose (PEREIRA, 2012).

Nas plantas, PLD e PA emergiram como moléculas envolvidas na transdução de sinal e metabolismo da membrana, tendo papel importante na regulação do crescimento, desenvolvimento e resposta ao estresse (CHEN et al., 2016).

Segundo Guo & Wang (2012) a folhas da *Arabidopsis thaliana*, possuem 12 genes que codificam PLD, os mesmos foram agrupados nas seguintes classes: PLD alfa, Omega,

épsilon.

A ação enzimática da fosfolipase D leva a hidrólise de ligações fosfodiésteres da fosfatidilcolina (PC), resultando na formação de ácido fosfatídico (PA) e colina. Além dessa reação de transfosfatidilação, onde o álcool primário é utilizado, preferencialmente no lugar da água, formando um fosfodilálcool. Somente a PLD realiza essa reação, assim o fosfodilálcool é utilizado para quantificar a atividade dessa enzima. Dessa forma o PLD cliva a ligação fosfodiéster da fosfatidilcolina (PC), resultando na produção de ácido fosfatídico (PA) e colina. PA poderá ser metabolizada para formar lipídeos, como diacilglicerol e ácido lisofosfatídico, que atuam como mensageiros secundários (MARCHINI, 2008).

A fosfolipase D (PLD) é uma enzima presente em todos os organismos conhecidos e a que possui o seu maior número de membros no reino vegetal. No genoma de *Arabidopsis thaliana*, por exemplo, estão presentes 12 membros desta família. é estruturada e caracterizada pela existência de um lado N- e C-terminal altamente conservados, sendo o lado C, reservado para processos catalíticos e o lado N para a ligação a regiões lipídicas. No lado C, existem dois *motif*, que são únicos para esta família de enzimas, e que promovem os processos catalíticos. Do lado N-terminal, podem estar presentes dois tipos de motivos, os PH e PX, e os C2. Os PH e PX fazem parte do mecanismo de transdução de sinal via PIP2 (aquaporinas), enquanto que o CE, através de sinalização via  $Ca^{2+}$ . Ambos estão envolvidos na ativação da enzima (CRUZ, 2010).

As fosfolipases D, têm sido implicadas em diversas respostas ao estresse das plantas. Em sua transcrição de genes, a aumento da atividade posterior a exposição e manipulação dos níveis de proteína PLD que ocasionam a alteração da tolerância ao estresse. A família PLD encontradas em plantas é grande e heterogêneo e com diferentes isoformas. O PLD e o seu produto, ácido fosfatídico, exercem os efeitos em cascatas de transdução final e por influenciar propriedades das membranas lipídicas (BARGMANN & MUNNIK, 2006).

Entre as PLD, as comumente encontradas em plantas são a PLD $\alpha$ . Trata-se de uma subfamília, dentro das PLD, com 3 membros, a PLD $\alpha$ 1, 2 e 3. As mesmas são reguladas através de concentrações na ordem milimolar de  $Ca^{2+}$  e não requerem a presença de PIP2, porém necessitam de um pH ácido. O processo de catálise das PLD, passa pela hidrólise de fosfolipídios estruturais da membrana plasmática, originando o ácido fosfatídico (PA) e um grupo hidrofílico livre. O PA entra em diversos processos celulares, metabólicos e de resposta

a estresse, o que auxilia na explicação da importância da PLD (CRUZ, 2010).

A atividade da PLD em plantas aumentam em diferentes tensões hiperosmóticas, tais como desidratação e salinidade. Sendo que as diferentes PLDs tem funções únicas. A PLD $\alpha$ 1 promove o fechamento dos estômatos e reduz a perda de água. PLD $\alpha$ 1 e PLD  $\delta$  estão envolvidos em mudanças de tolerância ao estresse salino. PLD $\alpha$ 3 e PLD $\epsilon$  promovem o crescimento vegetal e tolerância hiperosmótica. As diferentes PLD regulam a produção de ácido fosfatídico (PA), que é uma classe chave de mediadores lipídicos na resposta da planta ao estresse ambiental (HONG et al., 2010).

Estudos realizados em planta, por exemplo, em *Jatropha curcas* (pinhão manso), demonstram o papel que esta família de enzimas tem na resposta do estresse hídrico. Em situações deste estresse, as PLD, e o seu composto de catálise, PA atuam de múltiplas formas a fim de amenizar os efeitos do estresse. A produção de ABA, induzida por uma situação de estresse, leva a ativação da PLD $\alpha$ 1, que reduz PA, que por sua vez encontra-se no meio celular e liga-se a uma fosfatase, PP2C (ABI), ao qual regula negativamente a abertura dos estomas via ABA. As ligações de PA à PP2C irão promover um fecho estomático, contribuindo para uma redução da perda de água. “A situação de stress hídrico origina também uma reação entre a subunidade G $\alpha$  da proteína G, que se encontra na membrana plasmática, e a PLD $\alpha$ 1. Esta reação leva a uma inibição da abertura estomática, o que complementa a ação de PA” (CRUZ, 2010).

### **2.3 Transcriptômica**

Os últimos anos têm visto avanços revolucionários nas tecnologias de sequenciamento de DNA pois com o advento do sequenciamento de nova geração (NGS), é possível que milhões de bases possam ser sequenciadas de uma vez, por uma fração do custo em relação ao tradicional sequenciamento por Sanger (EGAN, 2012). Uma análise bastante beneficiada por tais avanços metodológicos foi a transcriptômica.

Transcriptômica é uma técnica amplamente utilizada que obtém informação sobre a abundância de múltiplos transcritos de RNA mensageiro (RNAm) em uma amostra biológica. Hoje sabe-se da importância do papel do RNA na regulação gênica, onde o RNA é capaz de controlar a tradução de RNAm em proteínas (GLAVES, 2011).

Estudos de RNAm visam observar o que está sendo transcrito do genoma total de uma espécie, afinal sabe-se que nem todos os genes são transcritos e expressos em todos os momentos. Este tipo de pesquisa também pode fornecer informações sobre as diferentes respostas que os organismos apresentam em condições diferentes, como clima, estresse hídrico, disponibilidade de nutrientes e respostas a doenças e patógenos (CLARK, 2012).

O transcriptoma é o conjunto completo de transcritos em uma célula, e também uma técnica que permite acessar a quantidade dos transcritos por célula em um determinado estágio de desenvolvimento. Compreender o transcriptoma é essencial para interpretar os elementos funcionais do genoma e revelar os componentes moleculares de células e tecidos. Os objetivos principais da transcriptômica são catalogar todas as espécies de transcrição, incluindo mRNAs, RNAs não-codificantes e pequenos RNAs, para determinar a estrutura da transcrição de genes, em termos dos seus locais de iniciação, 5' e 3', os padrões de splicing e de outras modificações pós-transcricionais, e para quantificar alteração dos níveis de expressão de cada transcrito durante o desenvolvimento e sob diferentes condições (WANG, 2010).

A técnica de RNAseq foi desenvolvida para o sequenciamento de RNA e usa recentes tecnologias de sequenciamento, esta foi a técnica utilizada para o sequenciamento da *Urochloa decumbens*. Um pool de RNA é convertido em uma biblioteca de fragmentos de cDNA com adaptadores em uma ou nas duas extremidades, cada molécula com ou sem amplificação é então sequenciada com métodos de alto rendimento obtendo sequências curtas: reads de 30 a 400 pb, dependendo da tecnologia de sequenciamento de DNA utilizada. Em princípio qualquer sequenciamento de alto rendimento pode ser usado para o RNAseq, já foram publicados trabalhos com Illumina IG, Applied Biosystems SOLiD, Roche 454 Life Science. Os reads resultantes são alinhados a genomas ou transcriptomas referências, ou montados de novo para produzir um mapa da transcrição, que consiste tanto das estruturas transcricionais quanto do nível de expressão para cada gene (WANG, 2010).

O RNA-seq, apresenta vantagens interessantes como o fato de que não é limitado a detecção de transcritos que correspondem a sequências genômicas existentes, o que é bom para estudar organismos não-modelos, que possuem sequências genômicas ainda não determinadas. A técnica revela a localização precisa das fronteiras da transcrição na resolução de até uma base, e os reads curtos de 30 pb permitem entender como dois éxons estão conectados, enquanto que os reads mais longos revelam a conectividade entre múltiplos

éxons, e o RNAseq também mostra as variações de sequências, como os SNPs, nas regiões transcritas. Estes fatores tornam possível o estudo de transcriptomas complexos através da metodologia de RNAseq (WANG, 2010).

## 2.4 Filogenia

Foi Darwin quem começou a conceituar filogenia, conjuntamente com o próprio conceito de ancestralidade comum entre espécies e seu único diagrama publicado de filogenia é representado por uma árvore. Desse modo as filogenias são a indicação das relações de ancestralidade supostas para um conjunto de espécies. A árvore pode ainda ser vista como uma representação de uma hipótese utilizada como modelo da mais provável história evolutiva de um grupo de sequência ou de organismos. As árvores são formadas por nós conectados por braços, onde nós terminais representam sequências do que está sendo estudado e nós internos são as hipóteses ancestrais. Assim a ancestralidade de todas as sequências da árvore é a raiz desta (SOUZA, 2011).

A conceituação de filogenia é a ancestralidade que há entre as espécies, desse modo a ancestralidade poderá ser representada por um diagrama ramificado, em que os seus elementos. São espécies e as suas ramificações demonstram a proximidade genealógica, existente entre uma espécie e outra (MANSOUR, 2013).

A reconstrução filogenética incide em estimar as relações de ancestralidade para um determinado número de organismos. O conjunto de árvores pode conter todas as árvores possíveis (algoritmos exatos), porém o grande tempo computacional para o mesmo, pode ser solucionado pela procura de uma árvore dentro de um subconjunto de árvores denominados algoritmos heurísticos. A tarefa da filogenética molecular é converter as informações contidas nas sequências numa árvore evolutiva (SOUZA, 2011).

A ideia de evolução aceita pela comunidade científica é que qualquer espécie deve ter pelo menos uma espécie ancestral comum. Ao se aplicar o raciocínio a todas as espécies, obtém-se a imagem de uma enorme sequência de divisões que se fragmentaram desde a primeira espécie ancestral a todos os seres vivos até as espécies existentes nos dias de hoje (MANSOUR, 2013).

Há uma diversidade de métodos para fazer isto. Metodologia de distância, baseados na ideia de que conhece a real distância evolutiva entre todos os membros de um grupo de sequências. E ainda há o método que procura a árvore cuja soma dos comprimentos dos

braços é o mínimo. E ainda tem-se a metodologia discreta, descritas pelos métodos de máxima parcimônia (MP) e a máxima verossimilhança (SOUZA, 2011).

Máxima parcimônia e máxima verossimilhança são métodos probabilísticos mais precisos do que os métodos baseados em distância, por não se basear no relógio molecular, teoria pela qual todos organismos evoluem a uma taxa constante (YANG & RANNALA, 2012).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Material biológico e extração de RNA para o sequenciamento.**

Os 164.920 transcritos únicos de *Urochloa decumbens* cv. *Basilisk* foram obtidos com a EMBRAPA Gado de Corte em Campo Grande - MS, que realizou a parte prática de acordo com a seguinte metodologia:

Perfilhos de *U. decumbens* foram colhidos. Eles foram enraizadas em vasos contendo solo adubado anteriormente (mistura de 0,2% de preto: terra vermelha 1:3, 0,2% de cal, 0,02% 0-20-20 fertilizantes e 0,005% de uréia) e foram mantidas em casa de vegetação. Quarenta e cinco dias depois, as plantas foram cortadas para estimular o perfilhamento. Após 15 dias, os jovens brotos foram removidos e transferidos para uma mesa hidropônica contendo solução de enraizamento preparada de acordo com Hoagland & Arnon (1950). Este procedimento foi realizado para padronizar a idade dos brotos usados na cultura hidropônica nas soluções com e sem alumínio (CHIARI et al., 2011). Plântulas de *U. decumbens* com 11 dias de idade, foram submetidas às condições de estresse (com alumínio) e não estresse (sem alumínio) em hidropônia por oito horas. O experimento foi inteiramente casualizado com três repetições, formadas por 20 plântulas cada. As pontas das raízes foram excisadas para extração de RNA total e enviadas para sequenciamento pela plataforma Illumina HiSeq™ 2000 no Beijing Genomics Institute (BGI). As seis bibliotecas construídas geraram aproximadamente 40 Gb de dados (DOS SANTOS, 2014).

### 3.2 Construção das bibliotecas de mRNA

No *Beijing Genomics Institute* (BGI) em Shenzhen, China, o RNA total foi tratado com Dnase e o mRNA foi isolado e purificado utilizando esferas magnéticas com oligo(dT). O mRNA purificado foi fragmentado por enzimas de restrição e, em seguida, a primeira fita de cDNA foi sintetizada. O mRNA molde foi removido e a segunda fita de cDNA foi sintetizada. Posteriormente, as extremidades dos cDNAs foram reparadas e foi adicionado ao meio um nucleotídeo A (adenina) em cada extremidade 3' para ligação com os adaptadores (linkers). Foi realizada uma PCR com oligonucleotídeos específicos para as sequências dos adaptadores, aumentando o número de fragmentos das bibliotecas. Para validação dos dados, as bibliotecas foram quantificadas e qualificadas usando o Agilent DNA 1000 no *Bionalyzer* e *ABI StepOnePlus Real-Time PCR System*. As bibliotecas de cDNA foram sequenciadas utilizando a plataforma Illumina HiSeq™ 2000.

### 3.3 Obtenção das sequências de fosfolipases do banco de dados.

Para realização das análises de fosfolipases em *U. decumbens*, inicialmente buscou-se todas as sequências de fosfolipases existentes no Genbank, banco de dados online do NCBI (Disponível em: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) para realização da comparação. Todas as sequências de nucleotídeos foram copiadas no formato FASTA.

Antes de realizar a análise filogenética, as sequências de nucleotídeos foram separadas por grupos onde cada uma delas foi comparada com outras sequências do banco de dados criado anteriormente através do Basic Local Alignment Search Tool (Blast), neste caso foi utilizado o Blastn (Disponível em: [www. http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/)) que faz uma comparação de sequências de nucleotídeos com um banco de dados de sequências de nucleotídeos. Em seguida foi criada uma tabela para cada tipo de fosfolipase da *U. decumbens* com as sequências do banco de dados que apresentaram maior similaridade.

### 3.4 Construção das árvores filogenéticas

Os alinhamentos múltiplos globais foram obtidos utilizando-se o programa Clustal X2.

Para a construção das árvores filogenéticas, foi preciso separar as sequências da *Urochloa decumbens* com sua respectiva sequência do banco de dados que apresentou maior similaridade.

A partir dos alinhamentos foram preparadas árvores filogenéticas utilizando-se o programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis ou MEGA6, utilizando-se o método de máxima parcimônia. Os ramos das árvores foram testados por bootstrap, com 1.000 repetições, ou seja, a árvore filogenética foi criada 1000 vezes para gerar um resultado.

Foram construídas 4 árvores, uma para PLA1, uma para PLB, uma para PLC e uma para PLD.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível encontrar fosfolipases sequenciadas no transcriptoma de *Urochloa decumbens*, que se dividiam nos grupos, PLA1, PLA2, PLC e PLD. Das fosfolipases sequenciadas no transcriptoma de *Urochloa decumbens*, 16 são PLA1, 14 são PLA2, 14 são PLC e 20 são PLD. A PLB não foi encontrada na espécie.

### 4.1 Resultados do alinhamento local feito pelo Blast

Das 16 sequências de fosfolipase PLA1 de *Urochloa decumbens*, 11 apresentaram maior similaridade com o painço (*Setaria italica*), 2 com o milho (*Zea mays*), 2 com o braquipódio (*Brachypodium distachyon*) e 1 com a tamareira (*Phoenix doctylifera*) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Sequências de PLA1 da *U. decumbens* e suas respectivas sequências mais similares do banco de dados do NCBI.

<i>Urochloa decumbens</i>	<i>GI/Ref</i>	<i>Planta</i>	<i>Score</i>	<i>E-value</i>	<i>Ident</i>
<i>CL1352.Contig1_All</i>	004953259.2	<i>Setaria italica</i>	1415	0.0	89%
<i>CL14285.Contig1_All</i>	004953259.2	<i>Setaria italica</i>	1415	0.0	89%
<i>CL19648.Contig1_All</i>	004962229.2	<i>Setaria italica</i>	1354	0.0	92%
<i>CL19648.Contig2_All</i>	004962229.2	<i>Setaria italica</i>	936	0.0	89%
<i>CL7968.Contig1_All</i>	012846470.2	<i>Setaria italica</i>	1762	0.0	93%
<i>CL7968.Contig2_All</i>	012846470.2	<i>Setaria italica</i>	1509	0.0	93%
<i>CL7968.Contig3_All</i>	012846470.2	<i>Setaria italica</i>	1558	0.0	93%
<i>CL7968.Contig4_All</i>	012846470.2	<i>Setaria italica</i>	1509	0.0	93%
<i>LOC100192094</i>	001137517.1	<i>Zea mays</i>	3245	0.0	100%
<i>CL7968.Contig5_All</i>	012846470.2	<i>Setaria italica</i>	1927	0.0	93%
<i>LOC101775172</i>	004953259.2	<i>Setaria italica</i>	3320	0.0	99%
<i>LOC100842858</i>	010237480.2	<i>Brachypodium distachyon</i>	3493	0.0	99%
<i>LOC101754842</i>	004962229.2	<i>Setaria italica</i>	3094	0.0	100%
<i>Gb EU961866.1 </i>	195624307	<i>Zea mays</i>	2799	0.0	99%
<i>LOC100824686</i>	003568539.3	<i>Brachypodium distachyon</i>	2298	0.0	99%
<i>LOC103711735</i>	008797998.1	<i>Phoenix dactylifera</i>	2938	0.0	100%

GI/Ref: número de identificação da sequência no banco de dados do NCBI; Score: número de pontos similares entre a sequência da *U. decumbens* e as do banco de dados; E-value: Expectation value; Ident: quantidade de pareamentos corretos.

Das 14 sequências de PLA2 de *Urochloa decumbens*, 9 apresentaram maior similaridade com o painço (*Setaria italica*), 2 com o milho (*Zea mays*), 1 com o braquipódio (*Brachypodium distachyon*), 1 com o arroz (*Oryza brachyantha*), e 1 com o trigo (*Triticum durum*) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Sequências de PLA2 da *U. decumbens* e suas respectivas sequências mais similares do banco de dados do NCBI

<i>Urochloa decumbens</i>	<i>GI/Ref</i>	<i>Planta</i>	<i>Score</i>	<i>E-value</i>	<i>Ident</i>
<i>CL12153.Contig1_All</i>	004984659.1	<i>Setaria italica</i>	232	2e-57	92%
<i>CL12153.Contig2_All</i>	004984659.1	<i>Setaria italica</i>	825	0.0	92%
<i>CL12153.Contig3_All</i>	004984659.1	<i>Setaria italica</i>	829	0.0	93%
<i>Unigene18672_All</i>	004954467.3	<i>Setaria italica</i>	618	e-173	91%
<i>Unigene69715_All</i>	004979382.1	<i>Setaria italica</i>	335	5e-88	91%
<i>Unigene69716_All</i>	004979382.1	<i>Setaria italica</i>	264	1e-66	90%
<i>Unigene72044_All</i>	004981972.1	<i>Setaria italica</i>	823	0.0	91%
<i>LOC101755821</i>	004984659.1	<i>Setaria italica</i>	1873	0.0	100%
<i>LOC100281846</i>	001154766.1	<i>Zea mays</i>	1451	0.0	97%
<i>LOC102719088</i>	573924433	<i>Oryza brachyantha</i>	1786	0.0	98%
<i>LOC101761534</i>	004954467.3	<i>Setaria italica</i>	940	0.0	100%
<i>LOC100831578</i>	003575937.3	<i>Brachypodium distachyon</i>	355	2e-94	100%
<i>sPLA2IV</i>	021448.1	<i>Triticum durum</i>	737	0.0	94%

GI/Ref: número de identificação da sequência no banco de dados do NCBI; Score: número de pontos similares entre a sequência da *U. decumbens* e as do banco de dados; E-value: Expectation value; Ident: quantidade de pareamentos corretos.

Das 14 sequências de PLC de *U. decumbens*, 8 apresentaram maior similaridade com o painço (*Setaria italica*), 3 com o milho (*Zea mays*), 1 com o braquipódio (*Brachypodium distachyon*), 1 com o arroz (*Oryza brachyantha*), e 1 com o sorgo (*Sorghum bicolor*) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Sequências de PLC da *U. decumbens* e suas respectivas sequências mais similares do banco de dados do NCBI.

<i>Urochloa decumbens</i>	<i>GI/Ref</i>	<i>Planta</i>	<i>Score</i>	<i>E-value</i>	<i>Ident</i>
<i>CL10507.Contig1_All</i>	014805511.1	<i>Setaria italica</i>	2038	0.0	95%
<i>CL10507.Contig2_All</i>	014805511.1	<i>Setaria italica</i>	2692	0.0	94%
<i>CL10507.Contig3_All</i>	014805511.1	<i>Setaria italica</i>	2694	0.0	94%
<i>CL10507.Contig5_All</i>	014805511.1	<i>Setaria italica</i>	2605	0.0	95%
<i>CL14515.Contig2_All</i>	004957548.3	<i>Setaria italica</i>	361	7e-96	87%
<i>CL20217.Contig1_All</i>	004960312.3	<i>Setaria italica</i>	783	0.0	94%
<i>CL20217.Contig2_All</i>	004960312.3	<i>Setaria italica</i>	787	0.0	93%
<i>LOC101774810</i>	014805511.1	<i>Setaria italica</i>	8915	0.0	99%
<i>gi 242084431 </i>	002442596.1	<i>Sorghum bicolor</i>	3834	0.0	98%
<i>LOC103626494</i>	008646911.1	<i>Zea mays</i>	4510	0.0	99%
<i>gb EU953212.1 </i>	195606999	<i>Zea mays</i>	4216	0.0	99%
<i>gi 162462712 </i>	001111784.1	<i>Zea mays</i>	4000	0.0	99%
<i>LOC102707180</i>	015843320.1	<i>Oryza brachyantha</i>	3243	0.0	100%
<i>LOC100840369</i>	003579013.3	<i>Brachypodium distachyon</i>	2187	0.0	100%

GI/Ref: número de identificação da sequência no banco de dados do NCBI; Score: número de pontos similares entre a sequência da *U. decumbens* e as do banco de dados; E-value: Expectation value; Ident: quantidade de pareamentos corretos.

Das 20 sequências de fosfolipase PLD de *U. decumbens*, 11 apresentaram maior similaridade com o painço (*Setaria italica*), 2 com o milho (*Zea mays*), 1 com o braquipódio (*Brachypodium distachyon*), 2 com o arroz (*Oryza brachyantha*), 1 com o arroz (*Oryza sativa*) e 1 com o sorgo (*Sorghum bicolor*), 1 com o algodoeiro (*Gossypium raimondii*) e 1 com a bananeira (*Musa acuminata*) (Tabela 4).

**Tabela 4.** Sequências de PLD da *U. decumbens* e suas respectivas sequências mais similares do banco de dados do NCBI.

<i>Urochloa decumbens</i>	<i>GI/Ref</i>	<i>Planta</i>	<i>Score</i>	<i>E-value</i>	<i>Ident</i>
<i>CL7256.Contig1_All</i>	004962277.2	<i>Setaria italica</i>	2345	0.0	96%
<i>CL7256.Contig2_All</i>	004967470.2	<i>Setaria italica</i>	2601	0.0	95%
<i>CL7256.Contig3_All</i>	004962277.2	<i>Setaria italica</i>	4984	0.0	94%
<i>CL7256.Contig4_All</i>	004967470.2	<i>Setaria italica</i>	3402	0.0	89%
<i>CL10037.Contig1_All</i>	004957462.3	<i>Setaria italica</i>	3727	0.0	93%
<i>CL10037.Contig3_All</i>	004957462.3	<i>Setaria italica</i>	3681	0.0	92%
<i>CL13849.Contig2_All</i>	008675020.1	<i>Zea mays</i>	1104	0.0	91%
<i>CL14118.Contig2_All</i>	004965886.3	<i>Setaria italica</i>	1443	0.0	89%
<i>CL15636.Contig2_All</i>	004983810.2	<i>Setaria italica</i>	4492	0.0	93%
<i>CL16886.Contig1_All</i>	012845716.1	<i>Setaria italica</i>	4066	0.0	93%
<i>LOC101776856</i>	004962277.2	<i>Setaria italica</i>	7466	0.0	99%
<i>LOC103630236</i>	008651305.1	<i>Zea mays</i>	7471	0.0	99%
<i>LOC102722297</i>	006654235.2	<i>Oryza brachyantha</i>	6595	0.0	99%
<i>LOC100831328</i>	010233198.2	<i>Brachypodium distachyon</i>	7632	0.0	100%
<i>LOC101783531</i>	004967470.2	<i>Setaria itálica</i>	7018	0.0	99%
<i>J075150K01</i>	242143.1	<i>Oryza sativa</i>	7493	0.0	99%
<i>LOC102722297</i>	006654236.2	<i>Oryza brachyantha</i>	6954	0.0	99%
<i>gi 242057196 </i>	002457699.1	<i>Sorghum bicolor</i>	6369	0.0	100%
<i>LOC105796852</i>	001134535.1	<i>Gossypium raimondii</i>	6171	0.0	99%
<i>LOC104000973</i>	009423150.1	<i>Musa acuminata</i>	7430	0.0	100%

GI/Ref: número de identificação da sequência no banco de dados do NCBI; Score: número de pontos similares entre a sequência da *U. decumbens* e as do banco de dados; E-value: Expectation value; Ident: quantidade de pareamentos corretos.

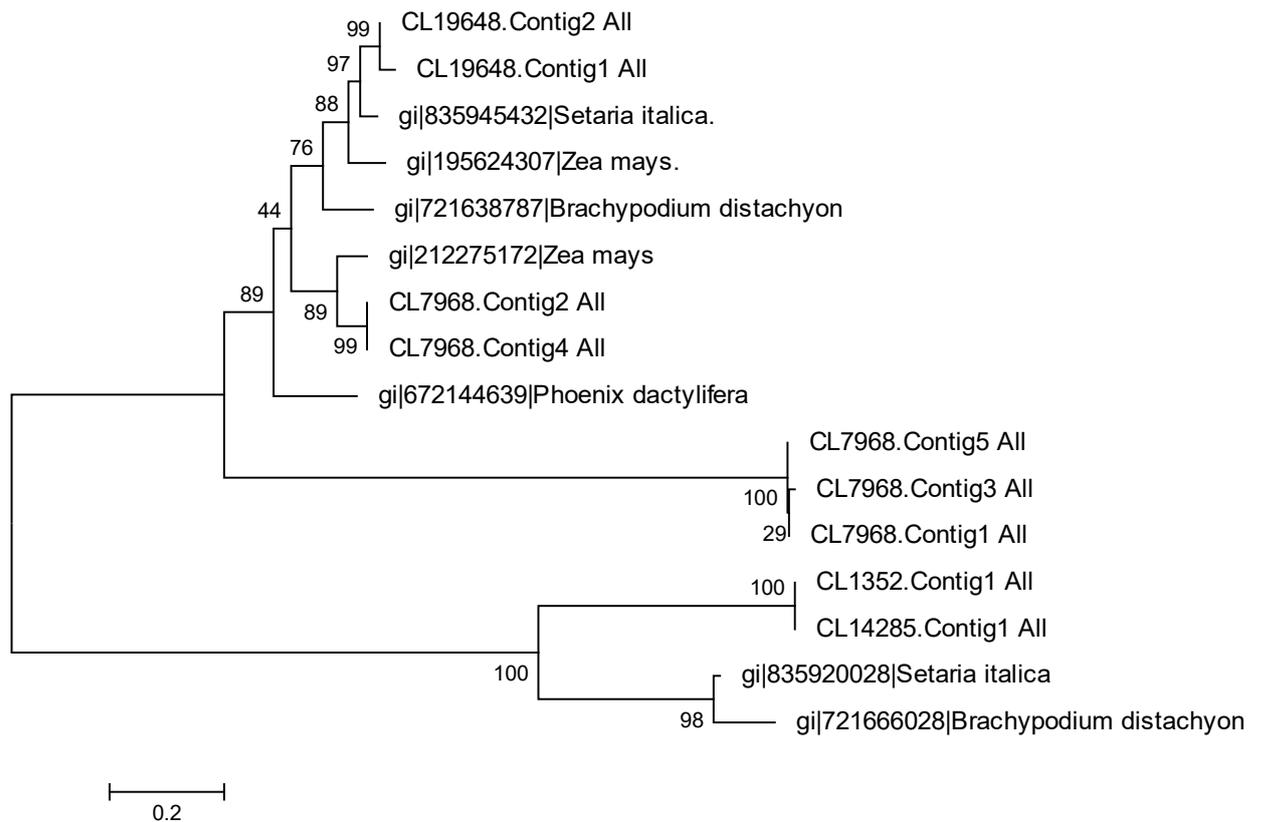
O Blastn foi realizado no começo do ano de 2017. É importante ressaltar que estes resultados podem variar a medida que o banco de nucleotídeos (Genbank) do NCBI for atualizado ao longo do tempo, ou seja, novas sequências são depositadas no banco de dados, podendo aparecer outras sequências que apresentam maior similaridade com as sequências da *U. decumbens*.

Como pode-se observar nas 4 tabelas anteriores, todas as sequências maiores (Contig) retornaram similaridade com a planta *Setaria itálica*. Quanto maior a sequência, mais bem caracterizada é a sua sequência, por isso a identidade é menor nos Contigs.

Também foi possível perceber que a maioria das sequências que apresentaram alta similaridade, são da família *Poaceae*, família com cerca de 793 gêneros e 10.000 espécies (Watson & Dallwitz, 1992), distribuídas em todas as regiões do globo.

## 4.2 Análise filogenética da PLA1

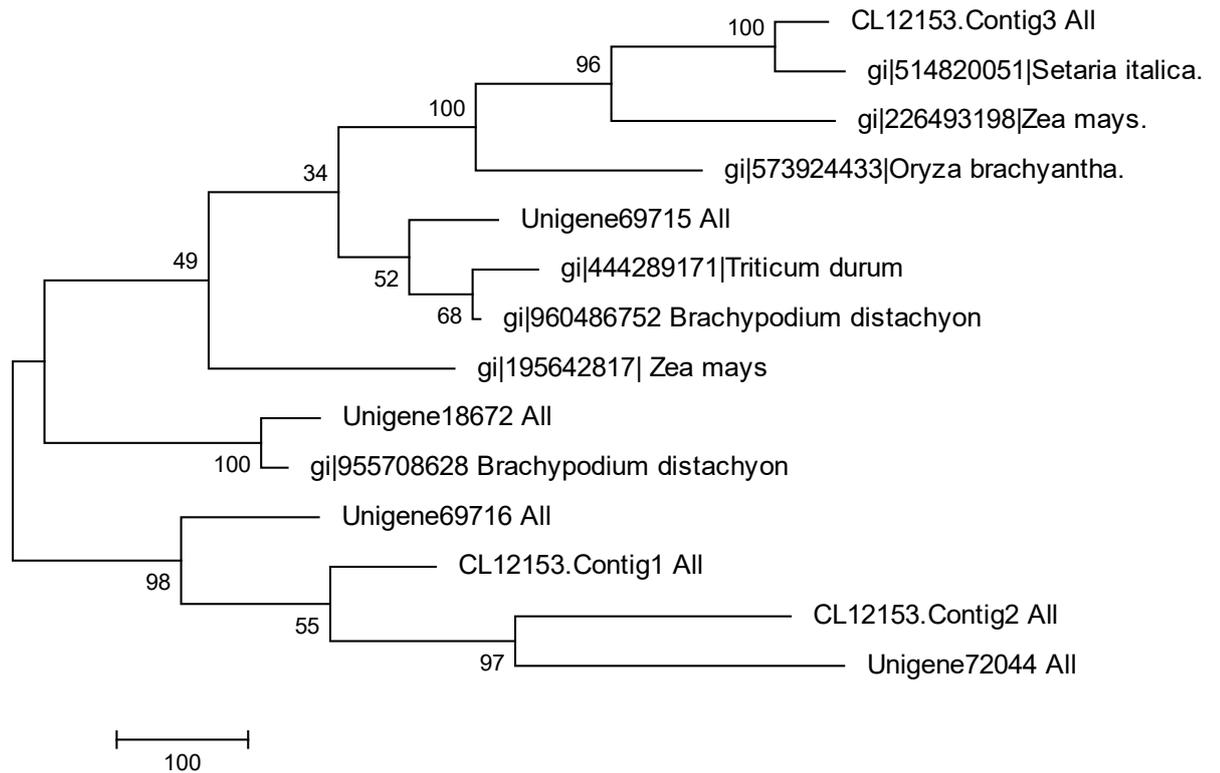
Na figura 5, o gene que codifica a PLA1 de *U. decumbens* foi mais proximamente relacionado ao gene de PLA1 de *Setaria italica*, o que pode ser observado na árvore filogenética entre as sequências: CL19648.Contig2.All, CL19648.Contig1.All e gi|83594532|*Setaria italica*.



**Figura 5.** Árvore filogenética com sequências de *U. decumbens* e fosfolipase do grupo A1

### 4.3 Análise filogenética da PLA2

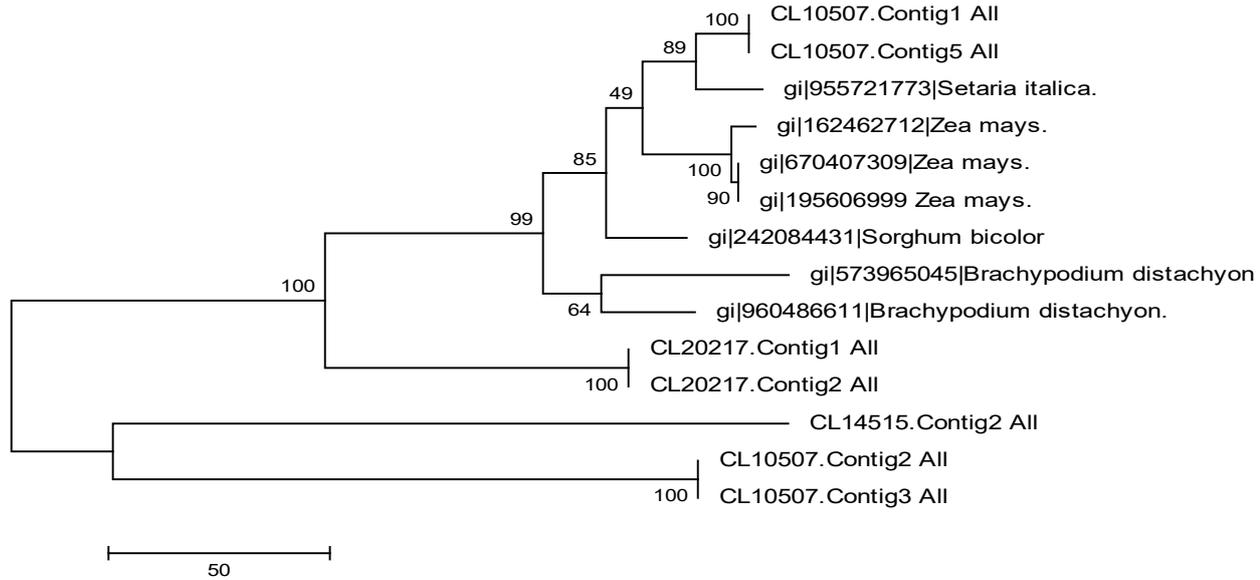
Na figura 6, foi possível observar que o gene codifica PLA2 da *U. decumbens*, teve maior homologia com gene PLA1 de *Setaria italica* e *Brachypodium distachyon*, o que pode ser observado na árvore filogenética entre CL12153.Contig3.All e gi|514820051|*Setaria italica* e também entre Unigene18672.All e gi|955708628| *Brachypodium distachyon*



**Figura 6.** Árvore filogenética com sequências de *Urochloa decumbens* e fosfolipases do grupo A2

#### 4.4 Análise filogenética da PLC

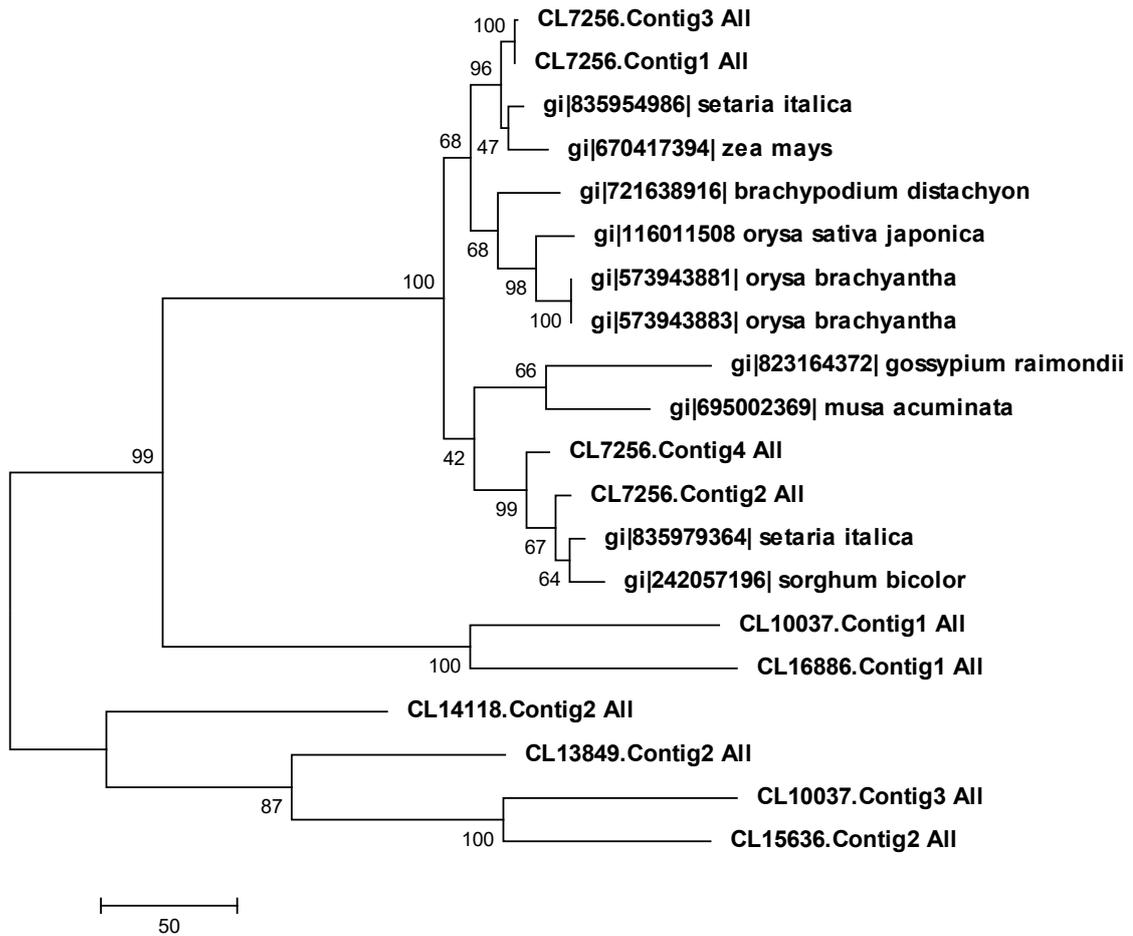
Na árvore filogenética abaixo (Figura 7), os genes PLC da *Urochloa decumbens*, possuem maior homologia com o gene PLC da *Setaria italica*; essa proximidade pode ser observada entre os genes CL10507.Contig1.All e CL10507.Contig5.All da *U.decumbens* e o gene gi|955721773|*Setaria italica*.



**Figura 7.** Árvore filogenética com sequências de *Urochloa decumbens* e fosfolipase do grupo C.

#### 4.5 Análise filogenética da PLD

Na figura abaixo, é possível observar maior proximidade entre os genes PLD da *U. decumbens*, com os genes PLD de *Setaria italica* e *Zea mays*; através dos genes CL7256.Contig3.All, CL7256.Contig1.All e gi|835954986|*Setaria italica* e gi|670417394|*Zea mays*.



**Figura 8.** Árvore filogenética com sequências de *Urochloa decumbens* e fosfolipase do grupo D.

## 5.CONCLUSÃO

Foi constatado a presença de genes que codificam a fosfolipase em sequências de DNA de *Urochloa decumbens*. Foi possível verificar que a planta expressa 4 tipos de fosfolipases, sendo elas: PLA1, PLA2, PLC e PLD. A planta não expressa a PLB.

Das 64 fosfolipases sequenciadas no transcriptoma de *Urochloa decumbens*, 16 são PLA1, 14 são PLA2, 14 são PLC e 20 são PLD. A fosfolipase B, não foi encontrada na braquiária.

Entre as fosfolipases encontradas, na análise de similaridade, 39 demonstraram elevada similaridade com *Setaria italica*, as demais apresentaram similaridade com outras plantas.

A análise filogenética demonstrou elevada homologia entre as sequências de *U. decumbens* e *Setaria italica*. Um número menor de sequências apresentou homologia com outras plantas.

## 6.REFERÊNCIAS

AHMED, M. et al. Biochemical characterization of the tomato phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) family and its role in plant immunity. **In Press, Corrected Proof**, 2016.

ALMEIDA, D. J. de. et al. Poaceae cespitosa e decumbente adubadas com NPK: efeitos na agregação do solo. **Pesquisa Agropec. Trop.**, Goiânia, v. 44, n. 1, p. 50-55, jan./mar. 2014.

ALVARENGA, E. C. et al. Potenciais alvos terapêuticos contra o câncer. **Ciência e Cultura**. São Paulo, v. 66, n. 1, p. 43-8, 2014.

ARAKAWA, J. A. R. **Fosfolipases C e sua interação com a fonte de carbono, cálcio, PKC e o ciclo de divisão celular em Aspergillus nidulans**. 68f. Tese de Doutorado (Ciências farmacêuticas). Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2009.

BARGMANN, B. O.; MUNNIK, T. The role of phospholipase D in plant stress responses. **Curr Opin Plant Biol.**, 2006.

CHEN, X. et al., Discovery of Potent and Orally Active Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 (Lp-PLA2) Inhibitors as a Potential Therapy for Diabetic Macular Edema. **J Med Chem.**, 2016.

CHIARI, L.; BITENCOURT, G. A. Aluminum tolerance on genotypes of signal grass. **R. Bras. Zootec.**, Viçosa , v. 40, n. 2, fev. 2011.

CLARK, D. P.; PAZDERNIK, N. J. Biotechnology. **Academic cell**, 2012.

CRUZ, T. M. C. D. **Abordagem fisiológica e molecular da capacidade de tolerância à seca de *Jatropha curcas* L.: uma planta resistente à seca**. 85f. Dissertação de Mestrado (Biologia animal). Universidade de Lisboa, 2010.

DOMINGUES, S. J. S. et al. Activation of phospholipase PLA2 activity in *Ricinus communis* leaves in response to mechanical wounding. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. Londrina, 2007.

DOS SANTOS, B.F.; VILELA, M.M.; LAURA, V.A.; NEPOMUCENO, A.L.; CHIARI, L. Análise do Transcriptoma de Raízes de Plântulas de *Urochloa decumbens* Cv. Basilisk (Syn. *Brachiaria decumbens* Cv. Basilisk) em Resposta ao Alumínio. EMBRAPA Gado de Corte. Resumo apresentado no **Workshop de Melhoramento Vegetal de Culturas do Cerrado – UFGD**, maio de 2014.

EGAN, A.N.; SCHLUETER, J.; SPOONER, D.M. Applications Of Next-Generation Sequencing In Plant Biology. **American Journal of Botany** v. 99, n.2, p. 175–185, 2012

FIGUEIRAS, T. S.; RODRIGUES, R. S.; SHIRASUNA, R. T. Braquiárias Invasoras no Estado de São Paulo. **Instituto Botânica**, 2012.

GIHYUN, L.; BAE, H. Bee Venom Phospholipase A2: Yesterday's Enemy Becomes Today's Friend. **Journal Toxins**, 2016.

GLAVES, P.D.; TUGWOOD, J.D. Generation and analysis of transcriptomics data. **Methods Mol. Biol.** v.69, p. 67-85, 2011.

GUO, L.; WANG, X. Crosstalk between phospholipase D and sphingosine kinase in plant stress signaling. **Front. Plant Sci.**, 2012.

HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica ilustrada**. Atmed, 2012.

HIRAYAMA T., OHTO C., MIZOGUCHI T., SHINOZAKI K. A gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stress in *Arabidopsis thaliana*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 1995.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soils**. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 347p., 1950.

HONG, Y.; ZHANG, W.; WANG, X. Phospholipase D and phosphatidic acid signalling in plant response to drought and salinity. **Plant Cell Environ.**, v. 33, n. 4, p. 627-35, abr., 2010.

IKEDA, F. S. et al. Emergência e crescimento inicial de cultivares de *Urochloa* em diferentes profundidades de semeadura. **Planta daninha**. Viçosa, 2013.

JABLONICKÁ, V. et al. Identification of a secretory phospholipase A2 from *Papaver somniferum* L. that transforms membrane phospholipids. **Phytochemistry**., v. 129, p. 4-13, set., 2016.

JANK L, VALLE C, RESENDE R. Breeding tropical forages. **CropBreed Appl Biotechnol** 34(spe):11–27, 2011.

JAKELAITIS, A. et al. Manejo De Plantas Daninhas No Consórcio De Milho Com Capim-Braquiária (*Brachiaria decumbens*). **Planta Daninha**. Viçosa-MG, v. 22, n. 4, p. 553-560, 2004.

LIM, H. J. et al. Cell-free synthesis of functional phospholipase A1 from *Serratia* sp. **Biotechnol Biofuels**., v. 9: 159, 2016.

KISRORE, V. et al. Inhibition of Group IIA Secretory Phospholipase A2 and its Inflammatory Reactions in Mice by Ethanolic Extract of *Andrographis paniculata*, a Well-known Medicinal Food. **Pharmacognosy Res.**, v.8, n. 3, p. 213–216, Jul-set., 2016.

KITAMURA, A. E. et al. Recuperação De Um Solo Degradado Com A Aplicação De Adubos Verdes E Lodo De Esgoto. **Revista Brasileira Ci. Solo**, v. 32, p. 405-416, 2008.

MANSOUR, E. R. M. **Método automático de determinação de clados utilizando algoritmo de detecção de comunidades**. 90f. Dissertação de Mestrado (Ciência). Universidade de São Paulo, 2013.

MARCHINI, C. M. M. **O papel funcional da enzima fosfolipase D2 (PLD2) nas células da linhagem de mastócitos RBL-2H3**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2008.

MIKAMI, K. Structural divergence and loss of phosphoinositide-specific phospholipase C signaling components during the evolution of the green plant lineage: implications from structural characteristics of algal components. *Front. Plant Science* 5:380, 2014.

MOHARANA, T. R. et al. Selective Enrichment of Omega-3 Fatty Acids in Oils by Phospholipase A1. **Journal Plos One**, v. 11, n. 3, 2016.

OLIVEIRA, T. C. de. **Mudanças conformacionais envolvidas na ativação interfacial de fosfolipasas A2-uma análise computacional**. 105 f. Dissertação de Mestrado (Bioquímica farmacológica). Universidade federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2006.

PEREIRA, F. D. C. **Caracterização Molecular E Expressão Heteróloga Do Alérgeno Fosfolipase A1 Do Veneno De *Polybia paulista* (Hymenoptera: Vespidae)**. 93f.

Dissertação de Mestrado (Biologia Celular e Molecular). Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 2012.

PEREIRA, M. R. R. et al. Influência Do Estresse Hídrico E Salino Na Germinação De *Urochloa decumbens* E *Urochloa ruziziensis*. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 28, n. 4, p. 537-545, Jul./Ago., 2012.

SAITO, K. Reminiscence of phospholipase B in *Penicillium notatum*. **Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences**, 2014.

SANTOS FILHO, N. A. **Caracterização funcional e estrutural de um inibidor de fosfolipase A2 tipo- $\alpha$  da serpente *Bothrops alternatus*: clonagem, expressão e mapeamento da região responsável pela atividade inibitória**. 148f. Tese de Doutorado (Ciência farmacêutica). Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2012.

SALGADO, L. R. et al. De novo RNA sequencing and analysis of the transcriptome of signalgrass (*Urochloa decumbens*) roots exposed to aluminum. **Plant Growth Regulation**, 2017.

SHIRASUNA, R.T. *Urochloa* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB26029>>. **BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. Rodriguésia**, v.66, n.4, p.1085-1113. 2015.

SIEBERS, M. et al. Lipids in plant–microbe interactions. **In Press, Corrected Proof**, 2016.

SOUZA, J. F. **Relações Filogenéticas Do Grupo Panarthropoda Avaliadas Através De Sequências Do Gene rDNA 18s**. 42f. Dissertação de Mestrado (Genética). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2011.

SUH, P. G. et al. Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. **BMB Rep.**, v. 30, n.41, p. 415-34, jun., 2008.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nat Rev Genet.**, v.10, n.1, p. 57–63, 2010.

WATSON, L.; DALLWITZ, M.J., The grass genera of the world. Wallingford, **C.A.B. International**, 1081p.,1992.

YANG, Z.; RANNALA B., Molecular phylogenetics:principles and practice, **Macmillan Publishers Limited.**, 2012.

VALLE, C.B, et al. Genero *Brachiaria*. In: Martuscello DMDF, Azevedo J (eds) **Plantas forrageiras**, 1st edn. Editora UFV, Vicososa, pp 30–77, 2010.