



ENEPEX

ENCONTRO DE ENSINO,
PESQUISA E EXTENSÃO

8° ENEPE UFGD • 5° EPEX UEMS

FAMÍLIA DEFENSINA DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM *Urochloa* *decumbens* cv. Basilisk

Karina Tamie Shirakawa¹; Lucimara Chiari²; Rodrigo Matheus Pereira³

UFGD/FCBA - Caixa Postal 533, 79.804-970, Dourados MS, E-mail: katydamie@gmail.com.br

¹ PIBIC/UFGD/CNPq

² Pesquisadora da EMBRAPA Gado de Corte, Campo Grande, MS

³ Orientador. Docente na Graduação em Biotecnologia da UFGD

RESUMO

O capim-braquiária é muito utilizado no Brasil, principalmente no cerrado, como forrageira devido a sua alta adaptabilidade a variados solos, como solos ácidos ou pobres em nutrientes; e apresenta alta cobertura e produção de biomassa. Os peptídeos antimicrobianos são moléculas proteicas pequenas produzidas por todos os seres vivos como parte do sistema imune inato para combater infecções e patógenos. Peptídeos antimicrobianos vegetais possuem um amplo espectro de atividades antimicrobianas contra fitopatógenos e a grande maioria deles é ativa contra fungos, enquanto alguns são inibidores de bactérias e insetos herbívoros. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi verificar e identificar a presença de peptídeos antimicrobianos da família das defensinas em *U. decumbens* por meio da comparação entre as sequências do transcriptoma da planta contra as sequências de aminoácidos de peptídeos antimicrobianos. O transcriptoma da planta foi fornecido pela EMBRAPA Gado de Corte (Campo Grande, MS), obtido pela extração de RNA de plantas expostas a condições de estresse (com alumínio) e sem estresse (sem alumínio). As sequências dos peptídeos antimicrobianos foram baixadas do banco de dados online CAMP e foram formatadas em FASTA em um banco local no computador da FCBA, UFGD. Foi utilizado o blast local para fazer o alinhamento entre os 164.920 transcritos únicos da *U. decumbens* e as 5.906 sequências de peptídeos antimicrobianos. Deste alinhamento obteve-se 3.161 similaridades com 251 peptídeos diferentes. Para a análise dos resultados utilizou-se o MySQL, separando-os em famílias de acordo com a classificação do banco de dados CAMP e

selecionando um grupo amostral para a construção das árvores filogenéticas. A partir desta análise, obteve-se 261 similaridades com 52 peptídeos diferentes dentro da família das defensinas. A maioria dos peptídeos antimicrobianos identificados possui atividade antifúngica ou antimicrobiana, e são de origem vegetal o que condiz com os transcritos da gramínea.

Palavras-chave: Transcriptoma, gramíneas, AMPs

INTRODUÇÃO

Urochloa decumbens (Stapf) R. D. Webster cv. **Basilisk**, sinônimo de *Brachiaria decumbens* Stapf cv. **Basilisk** (OLIVEIRA et al., 2013), é popularmente conhecida como capim-braquiária (JAKELAITIS et al., 2004) e pertence à família *Graminea*, tribo *Poaceae* e gênero *Brachiaria*. É uma gramínea perene, herbácea que ocupa todo o terreno devido a sua capacidade de se alastrar pelos rizomas e raízes adventícias dos nós inferiores dos colmos, atingindo cerca de 60-70 cm de altura. Originária do leste africano, esta planta não é exigente quanto à fertilidade e possui boa adaptação na maioria dos solos, mesmo em solos fracos e arenosos ou acidificados e inférteis; além de possuir alta produção de biomassa durante todo o ano, proporcionando excelente cobertura vegetal (ANDREAZZA et al., 2013). Por causa destas características, essa gramínea tem sido amplamente utilizada na formação de pastagens no Brasil, principalmente na região do cerrado. Recentemente, foi realizado o transcriptoma das raízes de *U. decumbens* por meio da técnica de RNA-Seq, disponibilizando um banco de dados das sequências expressas para estudos básicos desta forrageira.

Por serem organismos sésseis, as plantas não podem se locomover em resposta a insultos bióticos ou abióticos, portanto, respondem a esses sinais e situações de estresse por meio de mecanismos para reconhecer e contra-atacar esses parasitas, causando uma cascata de reações bioquímicas e liberação de compostos químicos como respostas de barreira defensiva, sendo um desses mecanismos a liberação de moléculas antimicrobianas, dentre eles, os peptídeos antimicrobianos (BENKO-ISEPPON & CROVELLA, 2010).

Peptídeos antimicrobianos (PAMs ou AMPs, do inglês *Antimicrobial Peptides*) são componentes essenciais do sistema de defesa imune constantemente observado na natureza e amplamente encontrados em todo o espectro evolutivo dos organismos, desde simples bactérias a plantas e animais de fisiologia mais complexa (BELARMINO & BENKO-ISEPPON, 2010; ODINTSOVA & EGOROV, 2012). São moléculas protéicas pequenas, com

menos de 200 aminoácidos, catiônicas em pH neutro e com muitas regiões hidrofóbicas o que confere seu arranjo estrutural, formando uma estrutura anfipática, a qual permite sua interação com a parede celular aniônica e com a membrana plasmática fosfolipídica dos microrganismos. Os AMPs podem ser expressos constantemente ou em resposta a estímulos gerados por ferimentos ou invasões microbianas, constituindo uma pré- ou pós-barreira defensiva dos organismos. (HANCOCK & SAHL, 2006; BENKO-ISEPPON et al., 2010; ODINTSOVA & EGOROV, 2012).

Os AMPs vegetais apresentam um vasto espectro de atividades *in vitro* contra fitopatógenos e a grande maioria deles é ativa contra fungos enquanto alguns são inibidores de bactérias e insetos herbívoros (ODINTSOVA & EGOROV, 2012). Incontáveis exames de expressão revelaram que uma única interação entre planta e patógeno é capaz de restabelecer ou silenciar centenas de genes, muitos deles conhecidos, enquanto outros permanecem a serem descritos (BENKO-ISEPPON et al., 2010).

As defensas pertencem a maior e mais estudada família de AMPs e está amplamente distribuída pelo reino das plantas e animais. As defensas vegetais são peptídeos pequenos (45-54 aminoácidos) e catiônicos com um “motif” característico de oito resíduos de cisteína formando quatro pontes dissulfeto (BENKO-ISEPPON et al., 2010; ODINTSOVA & EGOROV, 2012) com exceção das defensas de flores, as quais possuem cinco pontes dissulfeto. Essas estruturas proteicas foram primeiramente encontradas em sementes de trigo e cevada e inicialmente designadas como um novo grupo de tioninas, chamadas de tioninas- γ . No entanto, estudos subsequentes mostraram que eles diferem-se estruturalmente das tioninas, mas possuem similaridade com as defensas de mamíferos e insetos, então elas foram renomeadas de “defensas vegetais” (ODINTSOVA & EGOROV, 2012).

Exceto pelos resíduos de cisteína, as sequências de aminoácidos das defensas são altamente variáveis entre as espécies vegetais, porém pode ser observada uma maior conservação dentro das famílias, como acontece com as famílias *Brassicaceae* e *Poaceae*. No entanto, em alguns casos, uma similaridade notável entre famílias não-relacionadas foi reportada, indicando a origem em comum de todas as defensas vegetais. Estudos *in vitro* tem revelado que as defensas vegetais possuem um amplo espectro de atividades que implicam em seu envolvimento em respostas a estresses bióticos e abióticos, sendo que a maioria desempenha atividade antifúngica. O papel protetor das defensas *in vivo* é suportado pela elevada tolerância a infecções de plantas transgênicas com expressão constitutiva dos genes correspondentes. Outro fato que recebe especial atenção é que alguns membros da família das defensas são ativos não apenas contra fungos fitopatógenos, mas

também contra patógenos humanos como *Candida albicans* (ODINTSOVA & EGOROV, 2012).

Diante do exposto o objetivo deste trabalho foi verificar e identificar a presença de peptídeos antimicrobianos da família das defensinas em *U. decumbens* por meio da comparação entre as sequências do transcriptoma da planta contra sequências de aminoácidos de peptídeos antimicrobianos.

***Urochloa decumbens* (Stapf) R. D. Webster cv. Basilisk (sin. *Brachiaria decumbens* Stapf cv. *Basilisk*)**

As plantas do gênero *Brachiaria* são forrageiras amplamente utilizadas em regiões tropicais como África, Ásia, Austrália e América do Sul (BRUM et al., 2007, 2009; SATURNINO, 2009). No Brasil, este gênero é a principal forrageira utilizada na formação de pastagens, ocupando cerca de 80 a 85% de aproximadamente 172 milhões de hectares de pastagens no país, de acordo com o IBGE de 2006 (MENDONÇA et al., 2010). No cerrado brasileiro há cerca de 51 milhões de hectares de *Brachiaria* spp., principalmente das espécies *Brachiaria brizantha* (30 milhões de hectares), *Brachiaria decumbens* (15 milhões de hectares) *Brachiaria humidicola* e outras (6 milhões de hectares) (MACEDO, 2005).

Existem duas cultivares de *U. decumbens*: a cultivar IPEAN foi a primeira a ser introduzida no Brasil, em 1952, pelo Instituto de Pesquisas Experimentais Agropecuárias do Norte (IPEAN), pertencente ao Ministério da Agricultura; e a Basilisk, mais conhecida como Australiana, importada da Austrália em 1972. A primeira cultivar caracteriza-se pela baixa produção de sementes e pelo elevado número de estolões, proporcionando boa cobertura vegetal, porém seu plantio é limitado, feito através de estolhos. Por outro lado, a cultivar Basilisk possui alto poder germinativo e floresce durante quase todo o ano.

PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS VEGETAIS

Um dos primeiros passos para desencadear a resposta imune está no reconhecimento de moléculas derivadas de patógenos ou de sinalização das plantas. A produção de alguns AMPs pode ser induzida apenas quando ocorre uma invasão patógena. A indução de genes relacionados à defesa resulta em uma variedade de processos restringindo a propagação de um patógeno nos tecidos vegetais (ODINTSOVA & EGOROV, 2012).

O mecanismo de defesa das plantas por indução pode ser classificado em três fatores: (1) a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio, consideradas tóxicas para os patógenos, que inicia uma cadeia de respostas, participando do reforço das paredes celulares ou como sinalizadores moleculares que ativam genes de defesa a desencadear a morte celular programada em determinados locais para limitar a propagação do patógeno através dos tecidos; (2) o reforço das paredes celulares vegetais alcançado pela ligação cruzada de componentes da parede celular e acumulação de lignina, compostos fenólicos, proteínas de hidroxiprolina e tioninas e deposição de novas substâncias; e (3) a produção de componentes antimicrobianos, dentre eles os peptídeos antimicrobianos, que inibem o crescimento patogênico (JONES & DANGL, 2006; ODINTSOVA & EGOROV, 2012).

Apesar dos peptídeos antimicrobianos vegetais serem atribuídos a diferentes classes de acordo com suas estruturas específicas, todos compartilham algumas características importantes. São considerados polipeptídeos básicos e relativamente pequenos (de 10 a 50 aminoácidos, no máximo 200 aminoácidos), caracterizados por pesos moleculares de até 10kDa, e que tendem a apresentar um número variável de resíduos de cisteína que contribuem na estabilização estrutural por meio da formação de ligações dissulfeto (LAY & ANDESON, 2005). São moléculas catiônicas com diversas regiões da cadeia hidrofóbica, o que permite dobrar-se em uma estrutura anfifílica com trechos da cadeia hidrofóbicos e carregados positivamente (HANCOCK & SAHL, 2006). Tem sido sugerido que pequenos peptídeos antimicrobianos ricos em cisteína podem representar até 3% do material genético de uma planta, desse modo milhares dessas moléculas podem existir no reino vegetal (SILVERSTEIN et al., 2007).

AMPs vegetais são classificados baseados na identidade de suas sequências de aminoácidos e o número e posição de cisteínas formando ligações dissulfeto. Até o momento, 10 famílias foram descritas em plantas (GARCÍA-OLMEDO et al., 1998; LAY & ANDERSON, 2005; ODINTSOVA & EGOROV, 2012), sendo elas as proteínas transferidoras de lipídeos (LTPs), tioninas, defensinas, peptídeos dos tipos *hevein* e *knottin*; assim como AMPs específicos como *snakins*, *sheperdinas* e AMPs 4-Cys isolados da *Macadamia integrifolia* (MPB-1), *Impatiens balsamina* (Ib-AMP) e *Zea mays*. Ciclotídeos são membros de uma família recentemente descoberta rica em cisteína e comumente encontrada nas Rubiaceae, Violaceae e Cucurbitaceae. Eles apresentam atividades antibacterianas e antivirais, assim como propriedades inseticidas (DALY et al., 2009 apud LÓPEZ-MEZA et al., 2011). Todos esses AMPs exercem seus efeitos na membrana plasmática de microrganismos que eles atacam, embora os mecanismos de ação possam variar

dependendo da família (DALY et al., 2009 apud LÓPEZ-MEZA et al., 2011). Mais especificadamente nas bactérias, o mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos ocorre sobre a superfície celular destes microrganismos, induzindo uma agitação em sua estrutura membranosa e acarretando em lise celular (VERLY, 2010).

BIOINFORMÁTICA E TRANSCRIPTÔMICA

A Bioinformática é uma área de pesquisa interdisciplinar que consiste na aplicação de técnicas matemáticas, estatísticas e computacionais para a resolução de problemas advindos da Biologia (SETUBAL & MEIDANIS, 1997), principalmente relacionados à Biologia Molecular e a Genética (LORENA & CARVALHO, 2003). Tal área de conhecimento surgiu da necessidade de análise dos dados gerados pelos sequenciadores automáticos de DNA que surgiram na segunda metade da década de 90, causando uma “explosão” na quantidade de sequências a serem armazenadas e interpretadas (PRODOSCIMI et al., 2002).

Em princípio, a Bioinformática trabalhava apenas com a genômica, entretanto, com o aumento exponencial do número de genomas sequenciados surge também a necessidade de processar e correlacionar as informações brutas dos bancos de dados existentes transformando-os em informação e, partindo desta informação, gerar conhecimento, que é a informação testada experimentalmente. Essa alteração de foco dos ácidos nucleicos para as proteínas, suas estruturas e funções, vias metabólicas e interações celulares, é a chamada “Era Pós-Genômica” (PRODOSCIMI et al., 2002). O termo “ômico” refere-se à análise global dos sistemas biológicos. Assim, além da genômica, outras ciências ômicas surgiram, como transcriptômica, proteômica e metabolômica, cada uma com seu próprio conjunto de instrumentos, técnicas, *softwares* e bases de dados (ESPÍNDOLA et al., 2010).

A transcriptômica, ou genômica funcional, é uma subdivisão da genômica e consiste no sequenciamento de transcritos gênicos com o objetivo de estudar a expressão gênica em larga escala (ANDRADE, 2006). Nos projetos de transcriptoma é realizado o sequenciamento parcial do DNA complementar (cDNAs, do inglês *complementary DNA*) representativo da população de RNA mensageiro (mRNA, do inglês *messenger RNA*), permitindo, através da comparação das sequências do cDNA, a identificação de diferentes transcritos e, pelo número de vezes em que cada transcrito é sequenciado, sua abundância na população (PRODOSCIMI et al., 2002). A técnica geralmente aplicada para essa análise baseia-se no isolamento e retro-transcrição de mRNAs, gerando sequências a partir de cada extremidade 5' e/ou 3', denominadas ESTs (*Expressed Sequence Tags*), além de poder gerar ESTs internas ao cDNA,

denominadas ORESTES (*Open Reading Frames EST Sequence*). Deste modo, através da análise do transcriptoma, pode-se definir em que período um gene é ativado ou inibido, permitindo, por exemplo, compreender como mudanças na atividade celular podem refletir ou contribuir para determinada doença (ANDRADE, 2006).

Atualmente, os avanços computacionais em paralelo com a internet, permitem a rápida análise e troca de informações presentes em bancos de dados biológicos *online*, possibilitando a construção de sistemas *in silico* para simulação de formas naturais e modificadas de produtos específicos (ESPÍNDOLA et al., 2010) ou para seleção de genes diferencialmente expressos (ANDRADE, 2006).

BANCO DE DADOS BIOLÓGICOS

Um banco de dados biológicos é o local onde são armazenadas as sequências, seja de nucleotídeos ou aminoácidos, que são utilizadas como referência ou ponto de partida para a comparação. Ele pode ser de acesso restrito, o qual não compartilha publicamente seu conteúdo, ou livre, que permite o acesso dos dados por qualquer usuário sem autorização prévia. Existem três grandes bancos públicos mundiais que trocam diariamente dados entre si: EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*, <http://www.embl.de/>), GenBank (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e DDBJ (*DNA Databank of Japan*, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) (EMBRAPA, 2007).

A crescente quantidade de sequências de nucleotídeos e aminoácidos de diversas espécies de organismos nos bancos de dados possibilitou o uso da abordagem computacional para descobrir genes ainda não identificados e compreender suas funções, estruturas e papel em alguns processos biológicos. Entre os diversos bancos de dados disponíveis, aqueles relacionados aos peptídeos antimicrobianos despertam grande interesse por sua funcionalidade e importante papel na defesa contra infecções microbianas em eucariontes multicelulares (BELARMINO & BENKO-ISEPPON, 2010).

Com o aumento do número de peptídeos antimicrobianos codificados, bancos de dados dedicados a essas moléculas foram criados e têm aumentado, com informações disponíveis e abrangendo dados taxonômicos, microbiológicos, físico-químicos e estruturais (HAMMANI et al., 2009 apud ODINTSOVA & EGOROV, 2012). Dentre eles, encontra-se o CAMP (*Collection of AntiMicrobial Peptides*, disponível em www.camp.bicnirrh.res.in/index.php), um banco de dados online e de livre acesso o qual é administrado e organizado manualmente. Os dados no CAMP são organizados em 17 campos: CAMP ID, sequência, tamanho da

sequência, organismo de origem, taxonomia, atividade, natureza da Gram, organismos-alvo, atividade hemolítica, PubMed ID, nome e definição da proteína, GenInfo ID, Swiss-Prot, números de acesso do PDB, comentários e o tipo de conjunto de dados (experimentalmente validado/patente/predição). Baseado em sua atividade, os peptídeos eram classificados em antibacteriano, antifúngico, antiviral ou antiparasitário (THOMAS et al., 2010), agora, após uma nova atualização em 2013, no lugar de antiparasitário há a não-classificadas, além das patentes, possuindo atualmente um total de 6756 sequências: 2822 antibacterianas, 1107 antifúngicas, 98 antivirais, 1879 não-classificadas e 1716 patentes (CAMP, 2014).

BLAST

O BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), como o próprio nome indica, é uma ferramenta de busca de similaridade entre sequências biológicas, de nucleotídeos ou aminoácidos. Ele deriva do algoritmo Smith e Waterman (1981), caracterizado por apresentar a pontuação máxima do alinhamento local de duas sequências por meio do método exaustivo (conhecido como programação dinâmica), porém, ao invés do método exaustivo, emprega a heurística baseada em “palavras”, um método muito mais rápido (EMBRAPA, 2007).

Comparando as sequências de proteínas ou nucleotídeos, o BLAST produz uma representação dos alinhamentos em gráfico de pontos (*dot plot*) na qual apresenta combinações em diagonais ao longo de uma matriz com as possíveis regiões similares entre aminoácidos ou nucleotídeos com valores atribuídos a cada uma das unidades correspondentes. Cada alinhamento retornado é marcado e a ele é atribuída uma medida de significância estatística, chamada de Medida Esperada (*E-value*, do inglês *Expectation Value*), que apresenta a probabilidade do alinhamento ter ocorrido ao acaso. Além disso, o BLAST considera a composição de aminoácidos da sequência de entrada (*Query sequence*) na sua estimativa de significância estatística, reduzindo assim, o número de resultados falso-positivos (WHEELER et al., 2007). Os alinhamentos retornados podem ser limitados por um E-value limite ou um intervalo.

MATERIAL E MÉTODOS

O transcriptoma das raízes de *Urochloa decumbens* cv. Basilisk foi obtido por meio da técnica de RNA-Seq de acordo com OLIVEIRA et al. (2013), e os transcritos foram fornecidos pela EMBRAPA Gado de Corte de Campo Grande – MS para a realização desse estudo. Foi realizada uma revisão bibliográfica sobre a gramínea para obter mais informações sobre a planta e sobre as pesquisas já existentes. Posteriormente, foi feito o *download* das sequências de peptídeos antimicrobianos do banco de dados CAMP (*Collection of AntiMicrobial Peptides*, disponível em www.camp.bicnirrh.res.in/index.php) convertendo-as para o formato FASTA e instalando-as em um banco de dados local na FCBA, UFGD. Depois foi realizada a comparação por similaridade dos transcritos de *U. decumbens* contra as sequências obtidas do banco CAMP utilizando o script *BLAST all* instalado em um computador da FCBA, UFGD. Foram considerados resultados positivos apenas aqueles com *E-value* menor que 1e-5. Os resultados foram armazenados em um banco de dados local usando o MySQL. O banco de dados local serviu para facilitar a análise das características de cada peptídeo. Os AMPs encontrados foram separados em famílias de acordo com a classificação do banco de dados CAMP, selecionando apenas um grupo amostral para a construção das árvores filogenéticas. Subsequentemente, foi realizada uma detalhada busca bibliográfica sobre os resultados encontrados para a discussão dos mesmos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do alinhamento entre os 164.920 transcritos únicos de *U. decumbens* e as 5.906 sequências de AMPs, obteve-se 3.161 similaridades com 251 AMPs diferentes. Utilizando o MySQL, esses resultados foram separados em famílias, de acordo com a classificação do CAMP, obtendo-se 261 similaridades com 52 AMPs diferentes dentro da família das defensinas, representadas abaixo (**Tabela 1**), sendo 50 AMPs de origem vegetal e 2 de origem animal.

Tabela 1. Distribuição dos 52 AMPs da família das defensinas encontrados em *U. decumbens*. Número de ocorrência (n°).

Nome do AMP	n°	Nome do AMP	n°
Pseudothionin-St1, Pth-St1	1	Defensin Tk-AMP-D4	6
Putative defense protein 3	1	Defensin Tk-AMP-D6.1	6
Gamma 2 purothionin	1	Defensin Tk-AMP-D5	6
FST	1	Defensin-like protein 6	6

Flower-specific defensin precursor	1	Defensin Tk-AMP-D6	6
Putative defense protein 2	1	Defensin	7
TPP3	1	Defensin Tk-AMP-D1.1	8
Nad 1	1	Defensin J1-2	8
NeThio2	1	Defensin Tk-AMP-D1	8
Antifungal protein AX1	1	Vv-AMP1	8
NpThio	1	Sd1	8
Pth-St1	2	Gamma-thionin homolog PPT	8
Putative defense protein Hdd11-like	2	Defensin-like protein 1	8
Flower-specific gamma-thionin	2	Defensin Tk-AMP-D2	8
Fabatin-1	3	Defensin Ec-AMP-D1	8
CcD1	3	Defensin-2	8
Defensin-like protein 10	3	Defensin Tk-AMP-D3	8
Gamma 1 hordothionin	3	Defensin-like protein 2	8
Defensin J1-1	3	Defensin Tm-AMP-D1.2	8
Fabatin-2	3	Defensin Ec-AMP-D2	8
Defensin-D7	4	P322	8
Sialpha 2	5	Defensin-like protein 4	8
Antimicrobial peptide D2	5	Defensin-1	8
Fa-AMP1	5	Defensin-like protein 5	8
Fa-AMP2	5	Flower-specific gamma-thionin	8
Antimicrobial peptide D2	5	Sd3	8

Como pode ser observado na **Figura 2**, grande parte dos AMPs encontrados possuem atividade antifúngica ou antimicrobiana, de acordo com a classificação do *Gene Ontology* (GO).

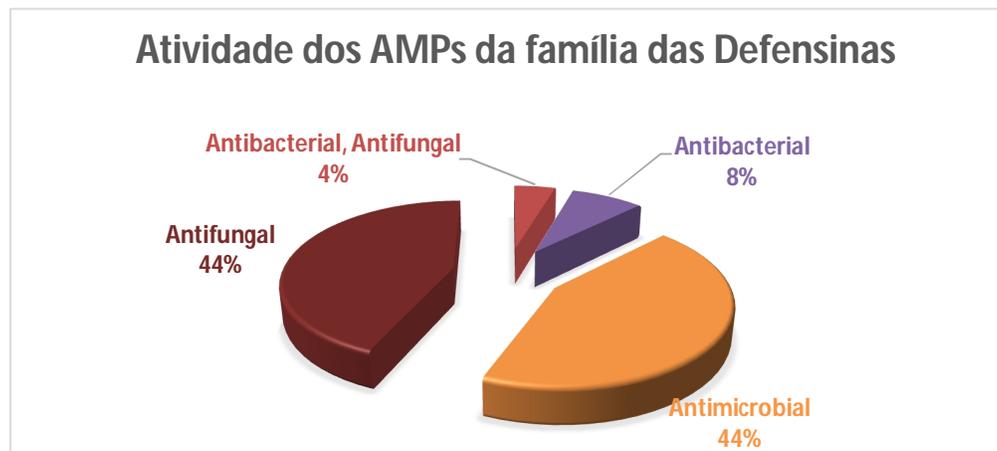


Figura 2. Atividade dos AMPs de Defensinas encontrados em *U. decumbens*.

Selecionou-se os peptídeos que apresentaram mais repetições e melhor *e-value* como amostra representativa. Com base nas árvores filogenéticas, observa-se que CL3663.Contig1_All e CL3663.Contig2_All encontram-se em um grande grupo apresentando maior homologia com *Setaria italica* e menor homologia com *Zea mays* e *Saccharum officinarum* (**Figura 3**). Na **Figura 4**, CL15448.Contig1_All e CL15448.Contig2_All apresentaram maior homologia com *Setaria italica* e menor homologia com *Zea mays* e *Shorghum bicolor*. Na **Figura 5**, observa-se que o Unigene11680 possui uma homologia distante com *Sorghum bicolor* e *Triticum aestivum*.

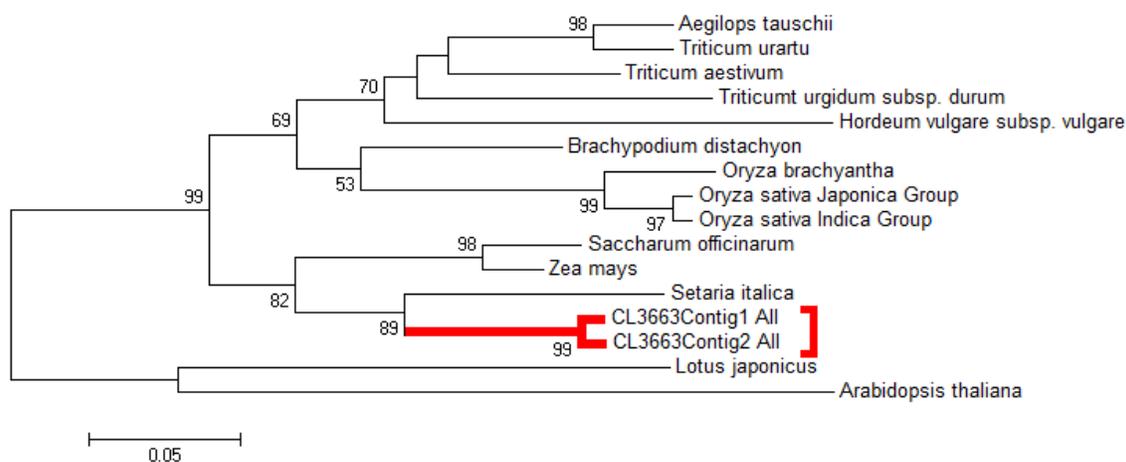


Figura 3. Árvore filogenética referente ao AMP Sd1, o qual retornou similaridade com o CL3663.Contig1_All e com o CL3663.Contig2_All de *U. decumbens*. Construída pelo método Neighbor-Joining com distância-p e bootstrap 1000 no programa MEGA 6.

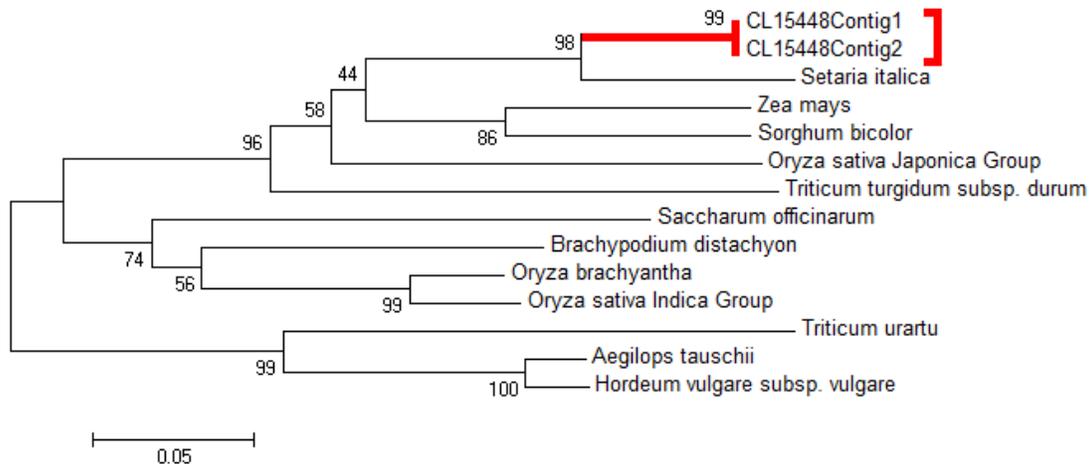


Figura 4. Árvore filogenética referente ao AMP Sd3, o qual retornou similaridade com o CL15448.Contig1_All e com o CL15448.Contig2_All de *U. decumbens*. Construída pelo método Neighbor-Joining com distância-p e bootstrap 1000 no programa MEGA 6.

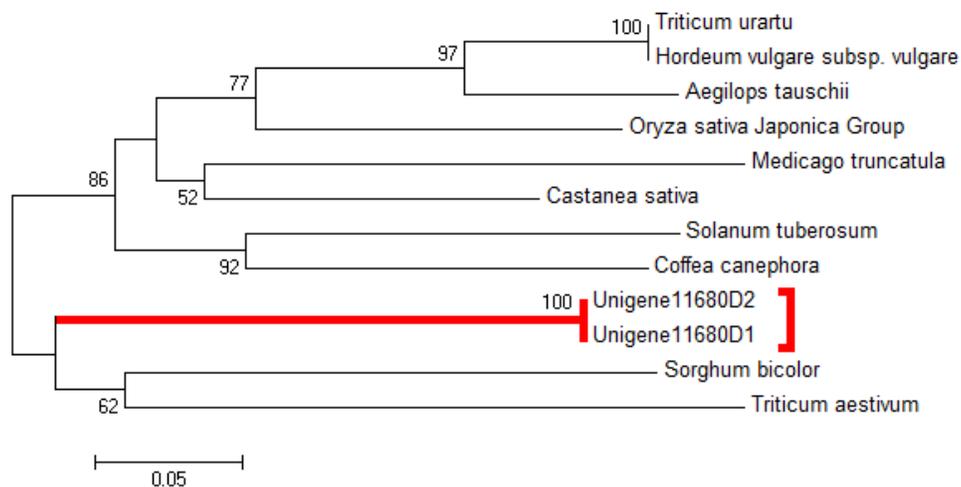


Figura 5. Árvore filogenética referente ao AMP Defensin_Ec-AMP-D1 e Defensin_Ec-AMP-D2, o qual retornou similaridade com o Unigene11680 e com o de *U. decumbens*. Construída pelo método Neighbor-Joining com distância-p e bootstrap 1000 no programa MEGA 6.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram encontradas 261 similaridades com 52 peptídeos antimicrobianos diferentes dentro da família das defensinas. Por ser encontrada em diferentes organismos, do reino vegetal e animais, as defensinas possuem um amplo espectro de atividades antimicrobianas como pode ser observado nos resultados encontrados: 44% antifúngica, 44% antimicrobiana (não definida), 8% antibacteriana e 4% antibacteriana e antifúngica.

AGRADECIMENTOS

À EMBRAPA Gado de Corte por realizar o transcriptoma de *U. decumbens*. Aos órgãos financiadores: FUNDECT, CAPES, CNPq, UNIPASTO.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, R. V. **Análise do Transcriptoma e da Expressão Diferencial de Genes de Micélio e Levedura de *Paracoccidioides brasiliensis***. 2006. 136 p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília – UnB, Brasília. 2006.

ANDREAZZA, R.; BORTOLON, L.; PIENIZ, S.; CAMARGO, F. A. O.; BORTOLON, E. S. O. Copper Phytoextraction and Phytostabilization by *Brachiaria decumbens* Stapf. Vineyard Soils and a Copper Mining Waste. **Open Journal of Soil Science**, v.3, p. 273-282, 2013.

BELARMINO, L. C.; BENKO-ISEPPON, A. M. Data Bank Based Mining on the Track of Antimicrobial Weapons in Plant Genomes. **Current Protein & Peptide Science**, v.11, n.3, p.195–198, 2010.

BENKO-ISEPPON, A. M.; et al. Overview on plant antimicrobial peptides. **Current protein peptide science**, v.11, n.3, p.181–188, 2010.

BENKO-ISEPPON, A. M.; CROVELLA, S. Ethnobotanical Bioprospection of Candidates for Potential Antimicrobial Drugs from Brazilian Plants: State of Art and Perspectives. **Current Protein and Peptide Science**. Pernambuco, v.11, n.3, p. 189-94, maio, 2010.

BOTREL, M. A.; NOVAES, L. P.; ALVIM, M. J. Características Forrageiras de algumas Gramíneas Tropicais. **EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite, Área de Difusão e Transferência de Tecnologias – ADT**, Juiz de Fora, MG, 1998.

BRUM, K. B.; HARAGUCHI, M.; LEMOS, R. A. A.; RIET-CORREA, F.; FIORAVANTI, M. C. Crytal-associated cholangiopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens* containing the saponin protodioscin. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.1, p.39-42, 2007.

BRUM, K. B.; HARAGUCHI, M.; GARUTTI, M. B.; NÓBREGA, F. N.; ROSA, B.; FIORAVANTI, M. C. S. Steroidal saponin concentrations in *Brachiaria decumbens* and *B. brizantha* at diferent developmental stages. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.1, p.279-281, 2009.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). O programa BLAST: guia prático de utilização. Documento 224. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, DF, 2007.

ESPINDOLA, F. S. et al., Recursos de Bioinformática Aplicados às Ciências ômicas como Genômica, Transcriptômica, Proteômica, Interatômica e Metabolômica. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.26, n.3, p.463-477, 2010.

- GARCÍA-OLMEDO, F.; MOLINA, A.; ALAMILLO, J.M.; RODRIGUEZ-PALENZUELA, P. Plant defense peptides. **Biopolymers (Pept Sci)**, v. 47, p. 479–49, 1998.
- HANCOCK, R. E. W.; SAHL, H.-G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1551–7, 2006.
- JAKELAITIS, A.; SILVA, A. A.; FERREIRA, L. R.; SILVA, A. F.; FREITAS, F. C. L. 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.
- JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The Plant Immune System. **Nature Publishing Group**, v.444, n.16, 2006.
- LAY, F.T.; ANDERSON, M.A. Defensins-components of the innate immune system in plants. **Current Protein and Peptide Science**, v. 6, p85-101, 2005.
- LÓPEZ-MEZA, J. E.; OCHOA-ZARZOSA, A.; AGUILAR, J. A.; LOEZA-LARA, P. D. Antimicrobial Peptides: Diversity and Perspectives for Their Biomedical Application. In: Dr. Sylwia Olsztyńska (Ed.) **Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies**. ISBN: 978-953-307-514-3, InTech, DOI: 10.5772/130582011. 2011.
- LORENA, A. C.; CARVALHO, A. C. P. L. F. Utilização de técnicas inteligentes em Bioinformática. Relatórios Técnicos do ICMC. **Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação**, São Carlos, SP, 2003.
- MACEDO, M. C. M. Pastagens no Ecosistema Cerrados: Evolução das Pesquisas para o Desenvolvimento Sustentável. Anais. **42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Goiânia, p.56-84, 2005.
- MENDONÇA, S. A.; MEIRELLES, P. R. L.; da SILVA, G. B.; FACTORI, M. A.; de ARRUDA, G. M. M. F.; da SILVEIRA, T. F. Melhoramento genético do gênero *Brachiaria*. Revisão de literatura. **VI Simpósio de Ciências da UNESP – Dracena, VII Encontro de Zootecnia – UNESP**, Dracena, 2010.
- ODINTSOVA, T.; EGOROV, T. Plant Antimicrobial Peptides. In: H. R. Irving; C. Gehring (Eds.); **Plant Signaling Peptides**. v. 16, p.107–133, 2012. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- OLIVEIRA, K. M. B.; CHIARI, L.; BARRIOS, S. C. L.; LAURA, V. A. Avaliação de Híbridos Intraespecíficos de *Brachiaria decumbens* Stapf (Poaceae) para Tolerância ao Alumínio. **EMBRAPA, I Workshop sobre Tolerância a Estresses Abióticos**. Campo Grande, MS, p.16-25, 2013.
- PRODOSCIMI, F. et al. Bioinformática: Manual do Usuário. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.5, n.29, p.12-25, 2002.
- RIET-CORREA, B.; CASTRO, M. B.; de LEMOS, R. A. A.; RIET-CORREA, G.; MUSTAFA, V.; RIET-CORREA, F. *Brachiaria* spp. Poisoning of ruminants in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 183-192, 2011.

SATURNINO, K. C. **Intoxicação experimental por *Brachiaria decumbens* em ovinos.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Programa de Mestrado em Ciência Animal, 2009.

SETUBAL, J.; MEIDANIS, J. Introduction to Computacional Molecular Biology. **PWS Publishing Company**, 1997.

SILVERSTEIN, K.A.; MOSKAL, W.A. Jr.; WU, H.C.; UNDERWOOD, B.A.; GRAHAM, M.A.; TOWN, C.D.; VANDENBOSCH, K.A. Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under- predicted in plants. **The Plant Journal**, v.51, p. 262-280, 2007.

THOMAS, S.; KARNIK, S.; BARAI, R. S.; JAYARAMAN, V. K.; IDICULA-THOMAS, S. CAMP: a useful resource for search on antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Research**, v.38, 2010.

VERLY, R. M. **Peptídeos antimicrobianos: Síntese, Ensaio Biológicos, Estudos Termodinâmicos e Análise Estrutural por RMN em Meio Biométricos.** 2010. Dissertação (Doutorado em Ciências - Química) – Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Exatas. Departamento de Química, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2010.

WHEELER, D. L. et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**, v. 35, 2007.