



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA PARAÍBA
CAMPUS PRINCESA ISABEL
CURSO SUPERIOR DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

IARA CAROLINA FERREIRA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA EM POALES E PERFIL DE
EXPRESSÃO *IN SILICO* DA OXIDASE TERMINAL DO PLASTÍDIO (PTOX) EM
Sorghum bicolor (L.) Moench**

PRINCESA ISABEL

2022

IARA CAROLINA FERREIRA DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA EM POALES E PERFIL DE EXPRESSÃO *IN SILICO* DA OXIDASE TERMINAL DO PLASTÍDIO (PTOX) EM *Sorghum bicolor* (L.) Moench

Trabalho de Conclusão do Curso, modelo Monografia, apresentado ao Curso Superior de Licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba, *Campus* Princesa Isabel, como requisito necessário para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Jeferson Sampaio Diogo

Coorientadora: Profa. Dra. Kátia Daniella da Cruz Saraiva

PRINCESA ISABEL

2022

Silva, Iara Carolina Ferreira da.
S586c Caracterização e análise filogenética em poales e perfil de
Expressão in silico da oxidase terminal do plastídio (ptox) em
Sorghum bicolor (L.) Moench / Iara Carolina Ferreira da Silva. –
2022.
49 f : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências
Biológicas) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da
Paraíba, Princesa Isabel, 2022.

Orientador(a): Prof. Dr. Ivan Jeferson Sampaio Diogo.

1. Genes PTOX. 2. Filogenética. 3. Bioinformática. I. Instituto
Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba. II. Título.

IFPB/PI CDU 575

Catálogo na Publicação elaborada pela Seção de Processamento Técnico da
Biblioteca Professor José Eduardo Nunes do Nascimento, do IFPB Campus Princesa Isabel.

TERMO DE APROVAÇÃO

IARA CAROLINA FERREIRA DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA EM POALES E PERFIL DE EXPRESSÃO *IN SILICO* DA OXIDASE TERMINAL DO PLASTÍDIO (PTOX) EM *Sorghum bicolor* (L.) Moench

Trabalho de Conclusão do Curso, modelo Monografia, apresentado ao Curso Superior de Licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba, campus Princesa Isabel, como requisito necessário para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas e aprovado pela banca examinadora.

Aprovado em: 14 / 11 / 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ivan Jeferson Sampaio Diogo (Orientador)

Instituto Federal da Paraíba - IFPB

Prof. Dr. Evaldo de Lira Azevedo

Instituto Federal da Paraíba - IFPB

Prof. Dr. Plínio Pereira Gomes Junior

Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE-UAST

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por me permitir chegar até aqui e por estar sempre comigo e com toda a minha família.

Ao meu pai, **Inaldo**, por todo o apoio e incentivo. A minha mãe **Maria José**, minha melhor amiga, por tudo, especialmente pelo incentivo e por sempre oferecer os melhores conselhos.

Aos meus companheiros da equipe Smigol, meus amados **irmãos**.

A minha orientadora, profa. **Dra. Kátia Daniella** agradeço pelos conhecimentos compartilhados, pelo apoio, paciência e dedicação em ajudar.

Ao meu orientador prof. **Dr. Ivan Sampaio** por ter topado, com prontidão, em nos ajudar nos prestando seu apoio.

Ao Prof. **Klérison Christy**, por todas as contribuições durante a disciplina de TCC.

Aos Professores **Evaldo de Lira Azevedo** e **Plínio Pereira Gomes Junior**, pela participação em minha banca.

Aos meus **amigos** da faculdade por tornarem os momentos difíceis mais fáceis e me divertirem tanto.

A minha bookstan preferida, **Maria Rebeca**, pelas melhores indicações de livros e por sempre se fazer presente, mesmo estando fisicamente longe.

A **Instituição IFPB**, em especial ao **Campus Princesa Isabel**, que auxiliaram em meu desenvolvimento ao longo desses anos.

Aos órgãos de fomento **Capes** e **CNPq** pelo suporte financeiro e apoio a este projeto de pesquisa.

Por fim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

*“O dia de amanhã cuidará de si mesmo.
Basta a cada dia o seu mal”*

Mateus 6,34

*“Para todos os males, há dois remédios:
o tempo e o silêncio”.*

*“A sabedoria humana está nessas palavras:
Esperar e ter esperança”.*

Alexandre Dumas – O Conde de Monte Cristo

RESUMO

A oxidase terminal do plastídio (PTOX) é uma enzima codificada no núcleo das células de organismos que podem desempenhar a fotossíntese oxigênica. Sua função tem sido associada à biossíntese de carotenóides, clororrespiração e respostas a diversos estresses ambientais em plantas. Devido a sua importância a PTOX tem sido alvo de diversos estudos bioquímicos e moleculares, sendo assim, o presente estudo teve como objetivo caracterizar *in silico* os genes da família multigênica da PTOX e analisá-los, filogeneticamente, em sorgo e outras espécies da ordem *Poales* (*Panicum hallii*, *Panicum virgatum*, *Setaria italica*, *Setaria viridis*, *Zea mays*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare* e *Oryza sativa*), que possuem o genoma disponível em bancos de dados públicos. Além disso, objetivamos também avaliar o perfil de expressão dos genes da PTOX em sorgo a partir de dados transcriptômicos. A identificação e anotação manual dos genes PTOX foi realizada a partir de buscas em bancos de dados públicos utilizando-se de sequências homólogas da PTOX de *Arabidopsis thaliana* através da ferramenta de alinhamento de sequências, o BLAST. A análise filogenética foi realizada a partir dos cDNA's deduzidos utilizando-se o programa MEGA 11 e sua respectiva extensão, o ClustalW, além disso, a espécie *Arabidopsis thaliana* (ordem *Brassicales*) foi utilizada como grupo externo. As análises de Bioinformática evidenciaram que o número de genes PTOX variou entre as espécies analisadas, no sorgo foram identificados apenas 2 genes PTOX e, nas outras espécies o menor número (apenas 1 gene) foi identificado em *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa* e em ambas as *Setarias*, já o maior número de genes foi observado em *Triticum aestivum* (3 genes). A estrutura éxon/intron é conservada entre os genes PTOX no sorgo e nas outras espécies da ordem *Poales*, todas possuem um quantitativo de 9 éxons e 8 íntrons. O alinhamento das sequências revelou identidades que variaram entre 61,83% a 99,47% em nucleotídeos, 64,84% a 99,69% nas sequências de aminoácidos deduzidas e 30,32% a 99,05% nos promotores. A análise filogenética demonstrou que os genes PTOX das *Poales* estão divididos em dois clados de genes ortólogos e são divergentes dos de *Arabidopsis thaliana*. A análise da caracterização gênica e da distribuição filogenética dos membros da família multigênica PTOX na ordem *Poales* proporcionou uma classificação confiável dentro do grupo das monocotiledôneas, além da identificação de genes ortólogos. Essa classificação dará suporte a estudos que objetivem identificar a função específica de cada membro gênico entre essas espécies. A análise do perfil de expressão *in silico* do sorgo foi gerada através de dados transcriptômicos (banco SRA) do GenBank, utilizando-se, partir desses dados, dois genótipos de sorgo, CSF 20 (tolerante à salinidade) e CSF 18 (sensível à salinidade). As análises revelaram que o padrão de expressão frente aos estresses isolados é diferente do padrão para o estresse combinado. O genótipo CSF 20 é mais indicado para situações de estresse isolados, enquanto o genótipo CSF 18 é mais indicado para situações de estresse combinados. Além disso, o gene *PTOX2b* apresentou maiores percentuais de expressão, o que nos remete que a indução de sua superexpressão pode ser utilizada como ferramenta biotecnológica para aumento da produção e tolerância de cultivares em regiões que predominem salinidade e altas temperaturas.

Palavras chave: Identificação, bioinformática, genes, tolerância.

RESUMEN

La oxidasa terminal del plásmido (PTOX) es una enzima codificada en los núcleos de las células de los organismos que pueden realizar la fotosíntesis oxigénica. Su función se ha asociado con la biosíntesis de carotenoides, la clororrespiración y las respuestas a diversos estreses ambientales en las plantas. Debido a su importancia, PTOX ha sido objeto de varios estudios bioquímicos y moleculares, por lo que el presente estudio tuvo como objetivo caracterizar *in silico* los genes de la familia multigénica *PTOX* y analizarlos, filogenéticamente, en sorgo y otras especies del orden Poales. (*Panicum hallii*, *Panicum virgatum*, *Setaria italica*, *Setaria viridis*, *Zea mays*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare* y *Oryza sativa*), las cuales tienen su genoma disponible en bases de datos públicas. Además, también buscamos evaluar el perfil de expresión de los genes *PTOX* en sorgo a partir de datos transcriptómicos. La identificación y anotación manual de los genes *PTOX* se realizó a partir de búsquedas en bases de datos públicas utilizando secuencias *PTOX* homólogas de *Arabidopsis thaliana* a través de la herramienta de alineación de secuencias, BLAST. El análisis filogenético se realizó a partir de los cDNA's deducidos mediante el programa MEGA 11 y su respectiva extensión, ClustalW, además, se utilizó como grupo externo la especie *Arabidopsis thaliana* (orden Brassicales). Los análisis bioinformáticos mostraron que el número de genes *PTOX* varió entre las especies analizadas, en sorgo solo se identificaron 2 genes *PTOX* y en las otras especies el menor número (solo 1 gen) se identificó en *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa* y en ambas *Setarias*, la el mayor número de genes se observó en *Triticum aestivum* (3 genes). La estructura exón/intrón se conserva entre los genes *PTOX* en sorgo y en otras especies del orden Poales, todas las cuales tienen una cantidad de 9 exones y 8 intrones. La alineación de secuencias reveló identidades que oscilaban entre 61,83 % y 99,47 % en nucleótidos, entre 64,84 % y 99,69 % en secuencias de aminoácidos deducidas y entre 30,32 % y 99,05 % en promotores. El análisis filogenético mostró que los genes *PTOX* de Poales se dividen en dos clados de genes ortólogos y son divergentes de los de *Arabidopsis thaliana*. El análisis de la caracterización génica y distribución filogenética de miembros de la familia multigénica *PTOX* en el orden Poales proporcionó una clasificación confiable dentro del grupo de monocotiledóneas, además de la identificación de genes ortólogos. Esta clasificación apoyará los estudios que tienen como objetivo identificar la función específica de cada miembro del gen entre estas especies. El análisis del perfil de expresión *in silico* del sorgo se generó utilizando datos transcriptómicos (banco SRA) de GenBank, utilizando, a partir de estos datos, dos genotipos de sorgo, CSF 20 (tolerante a la salinidad) y CSF 18 (sensible a la salinidad). Los análisis revelaron que el patrón de expresión ante estrés aislado es diferente al patrón de estrés combinado. El genotipo CSF 20 es más adecuado para situaciones de estrés aislado, mientras que el genotipo CSF 18 es más adecuado para situaciones de estrés combinado. Además, el gen *PTOX2b* mostró mayores porcentajes de expresión, lo que nos recuerda que la inducción de su sobreexpresión puede ser utilizada como herramienta biotecnológica para incrementar la producción y tolerancia de los cultivares en regiones donde predominan la salinidad y las altas temperaturas.

Palabras clave: Identificación, bioinformática, genes, tolerancia.

LISTA DE ABREVIATURAS

PTOX - Oxidase Terminal do Plastídio

APX - Ascorbato Peroxidase

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

cDNA - DNA complementar

UTR - Região não traduzida

NCBI - National Center for Biotechnology Information

BLAST - Ferramenta de busca de alinhamento local

SRA - Sequence Read Archive

RNA -seq - Sequenciamento de RNA

ABA - Ácido Abscísico

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3 REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1 A cultura do cultivo do Sorgo [<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench]	14
3.2 Respostas das plantas a estresses ambientais	15
3.3 A Oxidase Terminal do Plastídio (PTOX)	16
3.4 Estudos com a PTOX em monocotiledôneas	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Identificação <i>in silico</i> dos genes da PTOX em <i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench e em espécies da família das gramíneas.	19
4.2 Alinhamento das sequências e análise filogenética	19
4.3 Estrutura éxon-ínton dos genes da PTOX	20
4.4 Análise das regiões promotoras dos genes da PTOX em <i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	20
4.5 Análise da expressão <i>in silico</i> utilizando dados de RNA-Seq para <i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	20
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1 Identificação <i>in silico</i> dos genes da PTOX em <i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench e em espécies da família das gramíneas	22
5.2 Estrutura éxon-ínton dos genes <i>PTOX</i>	23
5.3 Análise dos domínios dos genes <i>PTOX</i>	24
5.4 Alinhamento das sequências e análise das relações filogenéticas entre os genes <i>PTOX</i> de gramíneas.	27
5.5 Análises das sequências de cDNAs, proteínas e promotores.	29
5.6 Análise das regiões promotoras dos genes da PTOX em <i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	35
5.7 Análise da expressão <i>in silico</i> utilizando dados de RNA-Seq para <i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench.	37
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

As plantas são afetadas constantemente por estresses ambientais que geram grandes perdas econômicas na agricultura a cada ano, restringindo a produtividade de inúmeras culturas de significância econômica. Estresses ambientais podem ser compreendidos como qualquer alteração que prejudique o ambiente, ocasionando alterações químicas, físicas e biológicas do meio, afetando o desenvolvimento das plantas (LEMOS, 2019). Podemos classificar os estresses ambientais em dois grupos, os fatores abióticos que podem ser provocados por excesso de luz, temperatura (alta e baixa), salinidade, inundação, seca, metais pesados, entre outros, os quais podem agir isoladamente ou de forma simultânea, e os fatores bióticos que são decorrentes do ataque de pragas e patógenos (ZANDALINAS *et al.*, 2017; LEMOS, 2019).

Uma vez que as plantas são expostas frequentemente a diversos estresses ambientais que prejudicam o seu crescimento e desenvolvimento, elas são capazes de perceberem os estímulos ambientais e desencadear um arsenal de mecanismos de defesas, os quais podem envolver a ativação de diversas vias especializadas (LEMOS, 2019). Uma das rotas para tentar sobrepujar os efeitos deletérios desses estresses nos vegetais é um sistema complexo de defesa antioxidante, que inclui antioxidantes enzimáticos como a superóxido dismutase (SOD), a ascorbato peroxidase (APX) e a catalase (CAT), e antioxidantes não-enzimáticos como a glutatona e os carotenóides. Recentemente, foi caracterizado mais um desses prováveis mecanismos de defesa, que foi chamado de cloro-respiração, isto se deu com a descoberta de uma enzima similar a oxidase alternativa da mitocôndria, a qual foi denominada de oxidase terminal do plastídeo (PTOX) (SOUSA, 2008).

Inicialmente, a oxidase terminal do plastídeo (PTOX) é uma enzima codificada no núcleo das células de organismos que podem desempenhar a fotossíntese oxigênica. A comprovação da existência dessa enzima foi realizada após a caracterização de mutantes de *Arabidopsis* que não continham o gene IMMUTANS. Segundo Carol (1999, n.p. apud MAIA, 2018), quando realizada a inativação desse gene nas plantas elas apresentam “folhas com setores verdes e brancos ou totalmente brancas, especialmente em condições de alta luminosidade”, sendo constatado que a descoloração desses setores torna-se irreversível em estágios iniciais do desenvolvimento da folha. A partir de estudos posteriores, foi possível descobrir o envolvimento desta enzima na resposta a estresses ambientais em plantas (CAROL *et al.*, 2001; KUNTZ., 2004; SUN *et al.*, 2011), além de ter sua função associada a cloro-respiração e a biossíntese de carotenóides. Como sendo parte de um sistema complexo

de defesa antioxidante (antioxidante enzimático) a oxidase terminal do plastídio é alvo de diversos estudos que visam a compreensão de seus mecanismos frente a estresses ambientais para o desenvolvimento de melhores cultivares e aumento da produtividade de diversas culturas, gerando benefícios sociais, econômicos e culturais.

Assim como as demais plantas, o sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) está suscetível a ser afetado por diversos fatores ambientais adversos (DIA RURAL, 2021), tais como a seca, a salinidade e as altas temperaturas, o que inviabiliza não apenas sua produção, mas a de culturas semelhantes (SARAIVA, 2017). A cultura do sorgo possui grande expressão social e econômica, sendo um grão oleaginoso originário da África que se espalhou a partir do século XIX por diversos continentes, chegando a ser comercializado no Brasil a partir do século XX (TAVARES, 2016). Atualmente, o sorgo consiste no quinto cereal mais produzido no mundo, ficando atrás apenas do trigo, do arroz, do milho e da cevada (PETERSEN, 2022). Apesar da cultura ser mais utilizada na alimentação animal, o sorgo é uma excelente matéria-prima para a alimentação humana pois é rico em fibras, em ácidos fenólicos e em taninos.

Tendo em consideração que o sorgo é uma cultura que possui grande significância no setor econômico, torna-se de grande importância estudos voltados a identificar e selecionar genes que melhor respondem a diversos fatores ambientais que podem ocasionar baixa produtividade e perda de plantios dessa cultura. Desta forma, de maneira geral, os estudos avaliam a expressão isolada de genes da *PTOX*, além disso, convém salientar que até o momento não se tem trabalhos visando caracterizar e avaliar o perfil de expressão de todos os membros da família gênica da *PTOX* em sorgo e outras espécies de gramíneas, e tão pouco realizar uma análise filogenética mais ampla dentro do grupo das monocotiledôneas e das gramíneas. Identifica-se estudos dessa natureza apenas em milho (*Zea mays*), soja (*Glycine max*), Lírio da paz (*Spathiphyllum wallisii*) e na aveia (*Avena sativa*) (SOUSA, 2008; IBÁNEZ *et al.*, 2010; LIMA, 2017; MAIA, 2018).

Portanto, neste trabalho, objetivamos caracterizar e analisar filogeneticamente os genes da família multigênica *PTOX* em sorgo e outras gramíneas, que possuem seu genoma disponível em bancos de dados públicos. Além disso, objetivamos também avaliar o perfil de expressão dos genes da *PTOX* em sorgo a partir de dados transcriptômicos. Nesse contexto, a utilização de bancos de dados genômicos e transcriptômicos empregando ferramentas de bioinformática é fundamental para a caracterização e entendimento dos perfis de expressão dos genes de interesse. Esse estudo serve como base para a identificação de genes alvo que poderão ser utilizados como ferramenta biotecnológica para obtenção de espécies mais

tolerantes a condições ambientais adversas, além de propiciar a prospecção de marcadores genéticos de tolerância a estresses.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Caracterizar e analisar filogeneticamente a família multigênica da Oxidase Terminal do Plastídio (PTOX) em plantas da ordem Poales, bem como avaliar o perfil de expressão em *Sorghum bicolor* (L.) Moench.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a família multigênica da *PTOX* em *Sorghum bicolor* (L.) Moench e de outras gramíneas (*Panicum hallii*, *Panicum virgatum*, *Setaria italica*, *Setaria viridis*, *Zea mays*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare* e *Oryza sativa*) por meio de buscas em bancos de dados e anotação gênica;
- Realizar análise de expressão gênica, *in silico*, utilizando bioprojetos de RNA-Seq disponíveis em bancos de dados públicos para a espécie *Sorghum bicolor* (L.) Moench em diferentes condições de estresse;
- Analisar filogeneticamente a família multigênica da *PTOX* em *Sorghum bicolor* (L.) Moench e de outras gramíneas (*Panicum hallii*, *Panicum virgatum*, *Setaria italica*, *Setaria viridis*, *Zea mays*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare* e *Oryza sativa*);
- Identificar possíveis genes alvo para o desenvolvimento de cultivares melhores adaptados às condições de estresse.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 A cultura do cultivo do Sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]

Na atualidade, o sorgo é considerado o quinto cereal mais importante do mundo, ficando atrás apenas do milho, do arroz, do trigo e da cevada (PETERSEN, 2022). Pertencente à família Poaceae e ao gênero *Sorghum*, a espécie *Sorghum bicolor* (L.) Moench originária da África tornou-se a mais cultivada (SARAIVA, 2017). A produção mundial de sorgo tem se mantido estável ao longo dos últimos anos, apresentando dificuldades em se estabelecer apenas na faixa acima de 60 milhões de toneladas. Dentre os maiores produtores mundiais dessa cultura, destaca-se em primeiro lugar os Estados Unidos que, na safra 2013/14, foi responsável por cerca de 16,5% de toda produção mundial. Em segundo lugar vem o México, seguido da Nigéria, da Índia e da China, correspondendo a cerca de 70% da produção mundial. Nesse ranking de produção do sorgo o Brasil ocupa a nona colocação (MALISZEWSKI, 2021).

O sorgo é uma cultura que apresenta elevada capacidade de adaptação a condições edafoclimáticas adversas, conservando um bom desempenho na sua produtividade. Devido a essa capacidade adaptativa, em algumas regiões como a África e a Ásia o sorgo é uma das principais fontes de energia, proteínas, vitaminas e minerais para milhões de pessoas pobres (EMBRAPA MILHO E SORGO, 2017; JARDIM *et al.*, 2020).

A cultura do sorgo foi introduzida no Brasil no início do século XX, mas não se firmou como uma cultura de comércio marcante, mesmo assim, o Brasil foi um dos poucos países nas últimas quatro décadas que apresentou um aumento considerável nas áreas plantadas, entre 1976/77 e 2013/14, a área com sorgo granífero teve aumento de 350%. Mesmo tendo nítido aumento da produtividade nas lavouras brasileiras nos últimos anos, a média nacional continua muito abaixo do potencial de rendimento de grãos dos híbridos de sorgo encontrados no mercado pelo mundo (SOLANO, 2016; EMBRAPA MILHO E SORGO, 2017; BORGES, 2019).

Agronomicamente as espécies do sorgo são classificadas em cinco grupos: granífero, sacarino, forrageiro, vassoura e biomassa. O primeiro grupo inclui plantas de baixa estatura adaptadas à colheita mecânica, o segundo engloba indivíduos de alto porte, adequados para a produção de silagem e/ou como alternativa para produção de açúcar e álcool. O terceiro grupo é utilizado principalmente para pastejo, complemento alimentar do gado, fenação e cobertura morta, já o quarto grupo é utilizado para confecção de vassouras e o quinto é destinado à produção de energia. O sorgo é uma espécie muito versátil e apresenta ampla utilidade na

dieta alimentar humana, seja de forma direta, como é o caso das farinhas e dos grãos, ou de forma indireta, na indústria de rações, em pastoreios diretos ou silagem para alimentação de animais (SOLANO, 2016)

3.2 Respostas das plantas a estresses ambientais

Estresses ambientais podem ser compreendidos como qualquer ação que perturbe o ambiente causando algum distúrbio resultando em alterações químicas, físicas e biológicas do meio. Desse modo, esses estresses podem ser divididos em dois grupos, as condições bióticas e abióticas, a primeira condição se refere a estresses causados por organismos vivos, como insetos, microrganismos, pragas ou patógenos, já a segunda, às condições abióticas, são aquelas causadas por determinados fatores ambientais como luminosidade, déficit hídrico, metais pesados, altas temperaturas, salinidade e danos oxidativos (SOUZA E RIBEIRO, 2015).

Quando submetidas a algum tipo de estresse, as plantas sofrem sérios danos nos aspectos morfológicos, fisiológicos e moleculares, isso faz com que o crescimento e o desenvolvimento reprodutivo das plantas seja afetado, acarretando no envelhecimento precoce ou até mesmo na morte desses organismos sésseis. Para tentar sobrepujar os efeitos dos estresses, as plantas podem desencadear e desenvolver mecanismos de resposta para se adaptarem às determinadas condições desfavoráveis para sua sobrevivência, com isso, muitas dessas alterações estão diretamente relacionadas à defesa e a proteção desses organismos (GOUVEIA E LIMA, 2017).

Para a defesa e a proteção as plantas ativam diversas vias, dentre elas, a defesa antioxidante, que inclui inúmeras enzimas e outras moléculas, como os carotenóides. O mecanismo de defesa antioxidante visa mitigar o excesso de espécies reativas do oxigênio (EROs) que, por sua vez, são subprodutos de reações redox, derivados de alterações na distribuição de elétrons nas reações metabólicas das plantas (SANTOS *et al.*, 2020). No que concerne a defesa, destaca-se o mecanismo de defesa antioxidante enzimático PTOX (Oxidase Terminal do Plastídio) enzima que tem sido indicada por diversos autores (MCDONALD *et al.*, 2011; SUN E WEN, 2011; LAUREAU *et al.*, 2013) como responsiva a diversos estresses ambientais, como salinidade, seca, altas temperaturas, alta luminosidade, dentre outros. Estudos realizados por Wang e colaboradores (2016) sugerem que a PTOX pode atuar como uma válvula de segurança, protegendo o *pool* de plastoquinona (PQ) da redução excessiva em condições de estresse abiótico. Um *pool* de PQ altamente reduzido

impede o fluxo de elétrons, sobrecarregando o fotossistema II (PSII), o que leva à geração de oxigênio singleto, uma espécie reativa de oxigênio altamente tóxica (WANG *et al.*, 2016). Além disso, a PTOX também está envolvida na biossíntese de carotenóides, que são eficazes antioxidantes não enzimáticos (LENNON *et al.*, 2003).

3.3 A Oxidase Terminal do Plastídio (PTOX)

A enzima Oxidase Terminal do Plastídio (PTOX), resultado do gene IMMUTANS de *Arabidopsis thaliana*, é encontrada apenas em organismos que realizam fotossíntese oxigênica, sendo codificada no núcleo das células. Quanto à sua localização subcelular, ela pode ser encontrada nos cloroplastos, possuindo, segundo Maia (2018, p.18), “uma sequência de endereçamento na extremidade amino-terminal responsável pela importação da proteína até o plastídio”. As proteínas carboxiladas do tipo di-ferro que englobam a AOX (Oxidase Alternativa) e a PTOX estão presentes em todos os reinos, envolvendo também o Archaeobacteria, nos aeróbios e nos anaeróbios (SOUSA, 2008).

A PTOX encontra-se ligada, dentro dos cloroplastos, aos tilacóides, possivelmente como uma proteína de membrana, orientada para o lado estromal. A existência da PTOX foi comprovada uma década após a primeira evidência de sua existência, em 1982, através da “caracterização de mutantes de *Arabidopsis* que não continham o gene IMMUTANS” (MAIA, 2018, p. 18). Relata-se que a ausência desse gene em *Arabidopsis* culminou no aparecimento de fenótipos diversos, apresentando folhas com partes verdes, brancas ou totalmente brancas, principalmente em ambientes e situações com alta luminosidade. Após essa descoberta, o papel fisiológico da PTOX e sua implicação nos processos metabólicos celulares ficou mais claro (LENNON *et al.*, 2003 apud MAIA, 2018).

Maia (p.19, 2018) acrescenta que, “a PTOX é homóloga da oxidase alternativa (AOX) de plantas, uma enzima resistente ao cianeto que atua transferindo elétrons do ubiquinol para o oxigênio molecular na via alternativa da respiração mitocondrial”. Além disso, a PTOX apresenta uma sensibilidade similar aos mesmos inibidores da AOX, n-octil, n-propil galato e ácido salicilhidroxâmico.

É observada a presença da PTOX em organismos pertencentes aos mais diversos grupos taxonômicos, dentre eles algas, diatomáceas, e representantes dos filos Cryptophyta e Haptophyta (NAWROCKI *et al.*, 2015). No que se refere ao papel fisiológico da PTOX, estudos apontam que “a PTOX atua como cofator na biossíntese de carotenóides, fornecendo plastoquinona oxidada, produto da sua reação, para a dessaturase do fitoeno (PDS) e a

dessaturase do zeta-caroteno (ZDS)” (MAIA, 2018, p. 22). Autores como Steccanella, Hansson e Jensen (2015) também destacam o envolvimento da PTOX na biossíntese da clorofila, posto que, “a plastoquinona oxidada é capaz de atuar como precursor da enzima ciclase redutase, que participa da biossíntese do pigmento” (MAIA, 2018, p. 22).

3.4 Estudos com a PTOX em monocotiledôneas

Como já frisado anteriormente, a PTOX é uma enzima codificada por um gene nuclear, sendo sintetizada como uma proteína precursora que contém uma extensão N-terminal a qual é proteoliticamente degradada após ser importada para o cloroplasto (CAROL *et al.*, 1999 apud SOUSA, 2008). As sequências da AOX e da PTOX se relacionam, onde ambas possuem na extremidade C-terminal um sítio ligante de ferro. A função metabólica e fisiológica dessas duas oxidases dissipadoras de energia ainda é alvo de muitas investigações. A partir de análises filogenéticas entre AOX e PTOX, foi possível perceber que se encontram em famílias separadas, genes da *PTOX* podem ser localizados em monocotiledôneas e na alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (SOUSA, 2008). Experimentos com “*light shift*” indicaram que a PTOX se expressa no início do desenvolvimento do cotilédone, assim, no decorrer dessa fase responsiva a luz o fenótipo dos cotilédones é determinado de forma irreversível de acordo com a luz do ambiente (WETZEL *et al.*, 1994, apud. SOUSA, 2008). Através de experimentos com promotores da PTOX e o gene repórter GUS, foi possível perceber que o padrão de “manchas brancas” e a localização da PTOX nos cloroplastos indicam que a PTOX é ativa em folhas.

De acordo com as análises filogenéticas realizadas por Sousa (2008), o milho (*Zea mays*) e o sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), pertencentes ao grupo das monocotiledôneas, compartilham dois genes ortólogos da *PTOX*, a saber, *ptox1* e *ptox2*. O autor destaca que a expressão desses genes no milho ocorre em dois tecidos diferentes, sendo que o *ptox2* é diferencialmente expresso nas folhas das espécies sujeitas a estresse hídrico. No entanto, nesse estudo, a expressão ficou confinada apenas aos dois genes no milho (SOUSA, 2008).

A PTOX atua como um cofator importante na biossíntese dos carotenóides, apesar dessa função não estar totalmente elucidada. Em plantas superiores é possível ressaltar o papel desse pigmento no aparelho fotossintético, participando do processo de coleta de luz e no processo de fotoproteção (LI *et al.*, 2008 apud. SOUSA, 2008). Além de atuar na biossíntese de carotenóides, a PTOX (quando a planta está submetida a estresses) pode se apresentar como uma válvula alternativa para o transporte de elétrons. Em condições de

estresse, o excesso de elétrons seria desviado não somente através dos fotossistemas, mas também pela PTOX, inibindo a formação de EROs (JOHNSON e STEPIEN, 2016 apud. LIMA, 2017).

Em um estudo de IBÁNEZ e colaboradores (2010), na espécie *Spathiphyllum wallisii* (Lírio da paz - monocots), adaptada à sombra, foram avaliadas as respostas da PTOX a estresses de seca, calor e temperatura elevada. A partir disso foi possível perceber tanto um aumento da expressão da enzima quanto da expressão do complexo NDH (desidrogenase alternativa), o que indicou que a PTOX está relacionada ao processo de aclimatação, já que cooperou para a continuidade da produção de ATP (Adenosina Trifosfato) e suprimiu a formação de EROs pelo excesso de elétrons dissipado no estresse (LIMA, 2017). Em plantas de cereal (*Avena sativa*) que se desenvolveram em circunstâncias de alta temperatura e luz elevada há uma “inibição do fotossistema II, um aumento da atividade do fotossistema I, e uma alta expressão dos genes da PTOX e do NDH em folhas jovens e maduras, possivelmente pela associação das duas vias para desviar o excesso de elétrons gerado pelo estresse” (TALLÓN e QUILES, 2007 apud. LIMA, 2017, p. 28). Quiles e colaboradores (2002), obtiveram um resultado parecido com o cereal, mas com os estresses como “aquecimento, alta intensidade de luz e elevada temperatura, e testando diretamente sistemas ligados às membranas dos tilacóides maduros da *Avena sativa*” (apud. LIMA, 2017, p. 28). Os resultados sugeriram que a PTOX atuou como “válvula de desvio de elétrons, já que em tecidos maduros o nível de expressão da PTOX envolvida na biossíntese de carotenóides é muito baixo” (KUNTZ, 2004 apud. LIMA, 2017, p. 28).

Além de trabalhos com alta intensidade de luz e altas temperaturas, muitos outros estudos mostraram que a PTOX também responde a estresse salino, seca e baixas temperaturas. Lima (2017, p. 30) sugere a hipótese que “de fato a PTOX atua como via alternativa na transferência de elétrons e que a formação de EROs seria mais uma função da proteína, como produtora dos precursores das cascatas de resposta a malefícios foto-oxidantes gerados”. Para além disso, os resultados desses estudos sugerem que a PTOX atua de forma distinta em diferentes espécies de plantas, estando relacionada ao desvio alternativo de elétrons em condições estressantes (SUN e WEN, 2011 apud. LIMA, 2017).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Identificação *in silico* dos genes da *PTOX* em *Sorghum bicolor* (L.) Moench e em espécies da família das gramíneas

A caracterização dos genes pertencentes à família multigênica da *PTOX* em sorgo e outras gramíneas (*Panicum hallii*, *Panicum virgatum*, *Setaria italica*, *Setaria viridis*, *Zea mays*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare* e *Oryza sativa*) foi realizada através de buscas no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando os bancos de dados *Nucleotide Collection* (NR), *Reference mRNA Sequences* (REFSEQ_RNA), *Reference Genomic Sequences* (REFSEQ_GENOMIC), *Expressed Sequence Tags* (EST), *Sequence Read Archive* (SRA), *Whole-Genomes Shotgun Reads* (WGS), *Transcriptome Shotgun Assembly* (TSA) e *Phytozome* (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). Inicialmente, os genes da *PTOX* foram identificados e selecionados de cada genoma utilizando uma sequência de proteína da *PTOX* de *Arabidopsis thaliana* como referência, através do tBLASTn.

Após selecionados, os genes foram manualmente anotados (determinação da posição da 5'-UTR, códon de iniciação, éxons, códon de parada e 3'-UTR) utilizando como referência sequências de cDNAs da *PTOX* depositados no refseq-rna (NCBI) com o auxílio da ferramenta BLASTn. Após a dedução dos cDNAs, estes foram traduzidos em sequências de aminoácidos usando o ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>). As proteínas deduzidas foram validadas a partir de sequências da *PTOX* disponíveis no GenBank usando a ferramenta BLASTp. A estratégia de anotação empregada foi a mesma proposta por Costa e colaboradores (2014).

4.2 Alinhamento das sequências e análise filogenética

Após a anotação dos genes das espécies da família das gramíneas realizou-se a análise filogenética a partir dos cDNAs obtidos. Estas sequências, juntamente com as de *Arabidopsis thaliana* da ordem Brassicaceae (usada como grupo externo) foram alinhadas através do programa CLUSTAL W e a relação evolucionária foi determinada pelo programa MEGA 11 empregando o método neighbor-joining (SAITOU e NEI, 1987) com valores de bootstrap (1.000 replicatas) (TAMURA *et al.*, 2011). As análises evolutivas realizadas pelo MEGA 11 são baseadas em alinhamentos múltiplos de sequências, entretanto, o programa em si não realiza esse tipo de alinhamento, ele possui uma extensão nativa do algoritmo ClustalW que

permite o alinhamento de sequências múltiplas, levando a resultados biologicamente significativos (KUMAR *et al.*, 2019).

4.3 Estrutura éxon-ítron dos genes da *PTOX*

A disposição dos éxons e íntrons de todos os genes da *PTOX* de espécies da ordem *Poales* foi realizada com o uso da ferramenta online *Gene Structure Display Server* (GSDS 2.0) (HU *et al.*, 2015). Esta configuração é obtida através do alinhamento do cDNA com a sua respectiva sequência gênica.

4.4 Análise das regiões promotoras dos genes da *PTOX* em *Sorghum bicolor* (L.) Moench

A presença de possíveis elementos *cis* regulatórios responsivos à estresses foi feita através de buscas utilizando a região upstream de 1000 pares de base do códon de início da tradução. A análise da presença de elementos *cis* foi feita por meio de dados disponíveis nos seguintes servidores: *New Place* (<https://integbio.jp/dbcatalog/en/record/nbdc00168>) (HIGO *et al.*, 1999), *PlantCARE* (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>) (LESCOT *et al.*, 2002) e *AtPAN* (<http://atpan.itps.ncku.edu.tw/>) (CHEN *et al.*, 2012).

4.5 Análise da expressão *in silico* utilizando dados de RNA-Seq para *Sorghum bicolor* (L.) Moench

No intuito de avançar na compreensão da função de cada membro, a expressão gênica foi avaliada através de dados de RNA-seq disponíveis no GenBank de diferentes condições de desenvolvimento e estresse, usando a espécie *Sorghum bicolor* como modelo de estudo. Para as análises de expressão *in silico*, foram selecionados experimentos depositados no banco de dados SRA (*Sequence Read Archive*) do GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>), os quais envolvem diferentes condições de estresse. Em seguida, esses dados (bibliotecas de cDNA) foram submetidos a diversos softwares computacionais aplicados em análise de dados de RNA-Seq. Inicialmente, as bibliotecas de cDNA foram analisadas quanto a qualidade das *reads*. Essa etapa foi realizada através do programa FastQC v.0.11.7, que verifica a qualidade das *reads* (ANDREWS, 2010). Em seguida, a ferramenta Trimmomatic v.0.36 (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>) (BOLGER *et al.*, 2014) foi aplicada, quando necessário, com o intuito de se remover as sequências dos adaptadores utilizados na construção da biblioteca de cDNA, assim como também visando a remoção das *reads* de

qualidade inferior, com um índice de qualidade Phred (Q) < 20, e das *reads* de tamanho muito reduzido (< 50 pb a depender do tamanho da *read*).

Após a avaliação da qualidade das *reads*, aquelas que apresentaram qualidade alta/média foram usadas para a etapa de mapeamento com os genes de interesse, utilizando os parâmetros padrões das ferramentas TopHat v. 2.1.1 (KIM *et al.*, 2013) e Bowtie v. 2.2.9 (LANGMEAD e SALZBERG, 2012). Para se obter a contagem bruta do número de *reads* que mapearam contra os genes de interesse foi empregada a ferramenta HTSeq v. 0.9.1 (https://htseq.readthedocs.io/en/release_0.9.1/) (ANDERS *et al.*, 2015) utilizando-se como base a anotação de referência (GTF). Os valores de contagem bruta dos genes foram normalizados de acordo com o tamanho da biblioteca utilizando o método de normalização contagem por milhão (CPM) presente na função `cpm` do pacote `edgeR` (ROBINSON *et al.*, 2010). Apenas transcritos com CPM ≥ 2 em pelo menos três das bibliotecas foram selecionados para análise de expressão.

A normalização e os genes diferencialmente expressos (GDEs) foram determinados através do programa R studio v. 3.4.1 (RCORE TEAM), utilizando o pacote DESeq2 v. 1.30.0 (<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html>) (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014). Foram considerados como diferencialmente expressos apenas os genes que apresentaram valor de p (p value) ajustado < 0,05 (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação *in silico* dos genes da *PTOX* em *Sorghum bicolor* (L.) Moench e em espécies da família das gramíneas

No presente estudo foram identificadas e anotadas manualmente um total de 15 sequências gênicas que codificam genes *PTOX*. Em sequência à anotação, fez-se uso da ferramenta de tradução Expasy (<http://www.expasy.org/>), onde por meio dos cDNAs obtidos foi possível deduzir as sequências de aminoácidos e localizar as regiões não traduzidas (UTRs 5' e 3') e as regiões promotoras a partir da identificação da metionina, que é o códon de iniciação da síntese protéica (ATG). Com base nas anotações dos genes *PTOX* foi possível analisar individualmente em cada espécie a quantidade de genes, o número de éxons e íntrons, o tamanho de cada gene e o número de aminoácidos em cada proteína deduzida, essas informações estão destacadas na **Tabela 1**.

Tabela 1: Caracterização do gene *PTOX* em *Sorghum bicolor* e outras espécies de gramíneas.

Espécie	Nº de Genes	Gene	Éxons	Íntrons	Nucleotídeos	Aminoácidos
<i>Sorghum bicolor</i>	2	<i>SbPTOX2.a</i>	9	8	1479pb	336aa
		<i>SbPTOX2.b</i>	9	8	1413pb	351aa
<i>Oryza sativa</i>	1	<i>OsPTOX1</i>	9	8	1412pb	336aa
<i>Setaria italica</i>	1	<i>SiPTOX2</i>	9	8	1594pb	321aa
<i>Setaria viridis</i>	1	<i>SvPTOX2</i>	9	8	1507pb	322aa
<i>Hordeum vulgare</i>	1	<i>HvPTOX1</i>	9	8	1301pb	336aa
<i>Panicum virgatum</i>	2	<i>PvPTOX2.a</i>	9	8	1418pb	344aa
		<i>PvPTOX2.b</i>	9	8	1653pb	345aa
<i>Panicum halli</i>	2	<i>PhPTOX2.a</i>	9	8	1684pb	346aa
		<i>PhPTOX2.b</i>	9	8	1681pb	345aa
<i>Zea mays</i>	2	<i>ZmPTOX2.a</i>	9	8	1305pb	341aa
		<i>ZmPTOX2.b</i>	9	8	1317pb	339aa
<i>Triticum aestivum</i>	3	<i>TaPTOX1.a</i>	9	8	1600pb	336aa
		<i>TaPTOX1.b</i>	9	8	1591pb	335aa
		<i>TaPTOX1.c</i>	9	8	1682pb	333aa
<i>Arabidopsis thaliana</i>	1	<i>At.PTOX</i>	9	8	1604pb	351aa

Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

Todas as espécies apresentaram um quantitativo de nove éxons e oito íntrons, o que indica que o gene *PTOX* é bastante conservado entre as espécies. O número de genes variou entre um e três, sem grandes disparidades, a *Triticum aestivum* foi a espécie que apresentou o

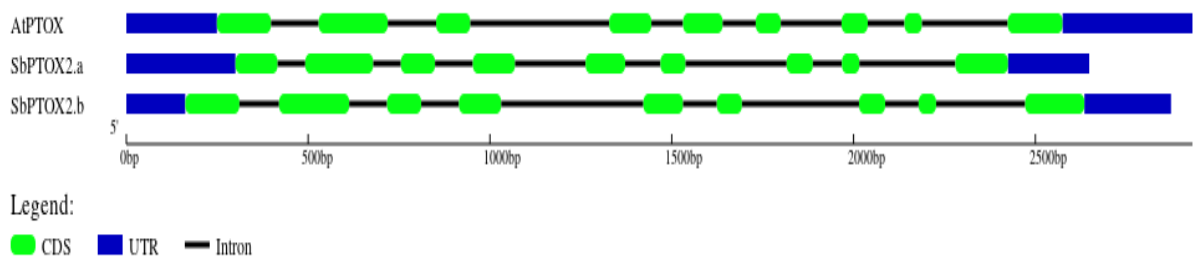
maior quantitativo deles (três genes), estando isso relacionado ao fato da espécie ter um arranjo de genoma hexaploide (seis cópias de cada cromossomo) (ZIMIN *et al.*, 2017).

Em conformidade com o trabalho de Sousa (2008), nas espécies *Zea mays* e *Sorghum bicolor* foram identificados dois genes *PTOX*, o tamanho e o número de aminoácidos dos genes de ambas as espécies estão dispostos na **Tabela 1**. Em análise a isso, o autor descreveu que o milho e o sorgo (monocotiledôneas) são espécies muito próximas e compartilham dois genes ortólogos da *PTOX* apresentados como *ptox1* e *ptox2*. Ressalta-se que genes ortólogos são genes homólogos que através de eventos de especiação evoluíram em diferentes espécies, no entanto, o gene ancestral bem como sua função foram preservados no processo de especiação, desta forma, genes ortólogos são encontrados em diferentes genomas de espécies que possuem ancestralidade em comum (PURCENA, 2020). Em face disso, os genes *PTOX* caracterizados no milho foram encontrados em raízes e folhas, e o gene nomeado como *ptox2* pareceu ser induzido em resposta ao estresse osmótico, o que nos permite inferir o traço responsivo a estresses abióticos dos genes *PTOX* do sorgo, já que se tratam de genes ortólogos ao do milho.

5.2 Estrutura éxon-íntron dos genes *PTOX*

A estrutura éxon-íntron dos genes *PTOX* em *Sorghum bicolor* e da espécie modelo *Arabidopsis thaliana* estão representados na **Figura 1**. A representação esquemática revela a presença de nove éxons (cor verde) e oito íntrons (linha preta) nos três genes analisados, ademais, as regiões 5'-UTR e 3'-UTR não traduzidas estão indicadas pela cor azul-escuro. Os três genes possuem tamanhos diferentes a partir da extremidade 5' em direção à extremidade 3', entretanto, constata-se que o tamanho dos éxons 3, 4, 5, 6, 7 e 8 são iguais. O primeiro éxon do gene *SbPTOX2.b* possui o mesmo tamanho do primeiro da *Arabidopsis thaliana*, já o último éxon nos três genes analisados possuem tamanhos diferentes. Com relação aos íntrons, em uma comparação entre os dois genes do Sorgo (*SbPTOX2.a* e *SbPTOX2.b*) e o gene da *Arabidopsis* (*At.PTOX*) não se observou grandes semelhanças quanto aos seus tamanhos, à exceção do íntron 3 entre os dois genes do sorgo, que possuem o mesmo tamanho. Dados equivalentes são encontrados para os genes ortólogos da *PTOX* no milho. A caracterização realizada no trabalho de Sousa (2008) demonstrou que ambos os genes *PTOX* do milho são constituídos por 9 éxons e 8 íntrons, os éxons, por sua vez, possuem tamanhos aproximados e os íntrons têm tamanhos distintos, além disso, o gene nomeado como *ptox2* possui um tamanho 10% maior que o da *ptox1*.

Figura 1: Representação esquemática da estrutura dos genes *PTOX* membros da família multigênica em *Sorghum bicolor* (sorgo) e *Arabidopsis thaliana*.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

Apesar de pertencerem a ordens diferentes, o sorgo e a *Arabidopsis* possuem características conservadas quanto à estrutura genética da *PTOX*, como o número de éxons e de íntrons, particularidades estas observadas em todas as espécies de gramíneas aqui anotadas.

5.3 Análise dos domínios dos genes *PTOX*

A localização subcelular das proteínas deduzidas foi determinada por meio da utilização do servidor web WOLF PSORT, onde pode-se observar a presença do peptídeo sinal de endereçamento para o cloroplasto, esse resultado já era esperado já que se trata de uma proteína endereçada aos cloroplastos e ligada aos tilacóides, possivelmente como uma proteína de membrana voltada para o lado estromal (MAIA, 2018).

Através do alinhamento múltiplo das sequências proteicas foram realizadas análises dos domínios com objetivo de identificar aqueles que são conservados nas sequências de aminoácidos das proteínas *PTOX*, assim, observou-se alta similaridade e conservação em determinadas regiões em todos os membros da família multigênica (**Figura 2**), sendo bastante comum que membros de genes evolutivamente relacionados partilhem alguns domínios, especialmente aqueles que compreendem famílias de genes e pertencem ao mesmo compartimento subcelular (CAVERZAN, 2008).

Em seu trabalho, Campos (*et al.*, 2016) destacou algumas regiões comuns conservadas das proteínas *PTOX*, as quais foram identificadas e destacadas nas proteínas anotadas e alinhadas do presente estudo. Entre os domínios conservados foi possível observar seis resíduos de cisteínas (indicadas pela cor lilás) e os aminoácidos necessários para a ligação de ferro (indicados pela cor verde). Observou-se também uma sequência conservada de 16 resíduos (indicados na cor amarela) que correspondem, segundo Fu (*et al.*, 2005), ao éxon 8 do gene IMMUTANS. Fu e colaboradores destacam que os aminoácidos conservados dentro deste domínio (que corresponde ao éxon 8) podem ser alterados, entretanto, a exclusão

Figura 2: Continuação.

HvPTOX1	NIKVFHFAESMNEFHLLIMEALGGNSVWIDRFLARFSAFFYYFVTVMYMLS PRMAYHFS	232
TaPTOX1.a	NIKVFHFAESMNEFHLLIMEALGGNSVWLD RFLARFSAFFYYFVTVGM YMLS PRMAYHFS	232
TaPTOX1.b	NIKVFHFAESMNEFHLLIMEALGGNSVWLD RFLARFSAFFYYFVTVGM YMLS PRMAYHFS	231
TaPTOX1.c	NIKVFHFAESMNEFHLLIMEALGGNSVWID RFLARFSAFFYYFVTVGM YMLS PRMAYHFS	229
OsPTOX1	YIKVFHFAESWNEFHLLIMEELGGNSLWVDRFLARFAAFFYYFMTVMYMLS PRMAYHFS	209
SiPTOX2	YIKVFHFAESWNEFHLLIMEELGGNALFFDRFLARFMAFFYYFMTVGM YMLS PRMAYHFS	211
SvPTOX2	YIKVFHFAESWNEFHLLIMEELGGNALFFDRFLARFMAFFYYFMTVGM YMLS PRMAYHFS	212
PvPTOX2.b	YIKVFHFAESWNEFHLLIMEELGGNALWIDRFLARFMAFFYYFMTVGM YMLS PRMAYHFS	220
PhPTOX2.a	YIKVFHFAESWNEFHLLIMEELGGNALWIDRFLARFMAFFYYFMTVGM YMLS PRMAYHFS	221
PhPTOX2.b	YIKVFHFAESWNEFHLLIMEELGGNALWIDRFLARFMAFFYYFMTVGM YMLS PRMAYHFS	220
PvPTOX2.a	YIKVFHFAESWNEFHLLIMEELGGNALWIDRFLARFMAFFYYFMTVGM YMLS PRMAYHFS	219
SbPTOX2.a	YIKVFHFAQSWNEFHLLIMEELGGNSLWIDCFLARFMAFFYYFVTVM YMLS PRMAYHFS	211
ZmPTOX2.a	YIKVFHFAQSWNEFHLLIMEELGGNSLWFDCLARFMAFFYYFMTVM YMLS PRMAYHFS	214
SbPTOX2.b	YIKVFHFAQSWNEFHLLIMEELGGNALWIDRFLARFMAFFYYFMTVM YMLS PRMAYHFS	224
ZmPTOX2.b	YIKVFHFAQSWNEFHLLIMEELGGNALWIDCFLARFMAFFYYFMTVM YMLS PRMAYHFS	216
	:*****:* ***** *:::.* ***** *****:*. ***:*****	
HvPTOX1	ECV ERHAYSTYDKFLKLNGEELKKLPAPEVAVNYM NEDLYMFDEFQTSRAPNSRRPKVD	292
TaPTOX1.a	ECV ERHAYSTYDKFLKLNGEELKKLPAPEVAVNYM NEDLYMFDEFQTSRAPNSRRPKVD	292
TaPTOX1.b	ECV ERHAYSTYDKFLKLNGEELKKLPAPEVAVNYM NEDLYMFDEFQTSRAPNSRRPKVD	291
TaPTOX1.c	ECV ERHAYSTYDKFLKLNGEELKKLPAPEVAVNYM NEDLYMFDEFQTSRAPNSRRPKVD	289
OsPTOX1	ECV ERHAYSTYDKFKIKLHEDELKKLPAPEAALNYL NEDLYLDEFQTARVPCSRRPKID	269
SiPTOX2	ECV ERHAYSTYDKFLKLNHEELKRLPAPEAALNYL NEDLYLDEFQTARVPCSRRPKID	271
SvPTOX2	ECV ERHAYSTYDKFLKLNHEELKRLPAPEAALNYL NEDLYLDEFQTARVPCSRRPKID	272
PvPTOX2.b	ECV ERHAYSTYDKFLKLNHEELKRLPAPEAALNYL NEDLYLDEFQTARVPCSRRPKID	280
PhPTOX2.a	ECV ERHAYSTYDKFLKLNHEELKRLPAPEAALNYL NEDLYLDEFQTARVPCSRRPKID	281
PhPTOX2.b	ECV ERHAYSTYDKFLKLNHEELKRLPAPEAALNYL NEDLYLDEFQTARVPCSRRPKID	280
PvPTOX2.a	ECV ERHAYSTYDKFLKLNHEELKRLPAPEAALNYL NEDLYLDEFQTARVPCSRRPKID	279
SbPTOX2.a	ECV ERHAYSTYDEFKLNHEELKRLPAPEAALNYL NEDLYLDEFQASRSPGSRRPKID	271
ZmPTOX2.a	ECV ERHAYSTYDEFKLNHEELKRLPAPEAALNYM NEDLYLDEFQASRTPGSRRPKID	274
SbPTOX2.b	ECV ERHAYSTYDKFLKLNHEELKRLPAPEAALNYL NEDLYLDEFQTARVPCSRRPKID	284
ZmPTOX2.b	ECV ERHAYSTYDKFLKLNHEELKRLPAPEAALNYL NEDLYLDEFQTRIPCSRRPKID	276
	*****:*:*:.* ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	
HvPTOX1	NLYDVFVNVRDDEAEHCCKTMKACQTHETLRS PHAVQSSIEADAE-----	336
TaPTOX1.a	NLYDVFVNVRDDEAEHCCKTMKACQTHETLRS PHAVQSSIEADAE-----	336
TaPTOX1.b	NLYDVFVNVRDDEAEHCCKTMKACQTHETLRS PHAVQSSIEADAE-----	335
TaPTOX1.c	NLYDVFVNVRDDEAEHCCKTMKACQTHETLRS PHAVQSSIEADAE-----	333
OsPTOX1	NLYDVFVNI RDDEAEHCCKTMKACQTHGNLRS PHSMQKLEADTECVIP--EDDCGEGIVDC	327
SiPTOX2	NLYDVFVNI RDDEAEHCCKTMKACQTDGSLRS PHSTQNCLEADTEGVIP--EK-----	321
SvPTOX2	NLYDVFVNI RDDEAEHCCKTMKACQTHGNLRS PHSTQNCLEADTEGVIP--EK-----	322
PvPTOX2.b	NLYDVFVNI RDDEAEHCCKTMKACQTHGNLRS PHSAHNCSEADMECVIP--ENDCGEGIVDR	338
PhPTOX2.a	NLYDVFVNI RDDEAEHCCKTMKACQTHGNLRS PHSTQNCLEADTECVIP--ENDCGEGIVDC	339
PhPTOX2.b	NLYDVFVNI RDDEAEHCCKTMKACQTHGNLRS PHSTQNCLEADTECVIP--GNDGEGIVDC	338
PvPTOX2.a	NLYDVFVNI RDDEAEHCCKTMKACQTHGNLRS PHSTQNCSEADTECVIP--ENDCGEGIVDC	337
SbPTOX2.a	NLYDVFVNI RDDEAEHCCKTMKACQTHGNLRS PHSTQNCLEADTECVIP--ENDCGEGIVDC	329
ZmPTOX2.a	NLYDVFVNI REDEAEHCCKTMKACQTHGNLRS PHSTPNCLEDDTECVIP--ENDCGEGIVDC	332
SbPTOX2.b	NLYDVFVNVRDDEAEHCCKTMKACQTHGNLRS PHSMDCLEVDSECVIPEPEDDCGEGFVDS	344
ZmPTOX2.b	NLYDVFVNI RDDEAEHCCKTMKACQTHGTLRS PHSMPCLEAATECVIP--ENDCGEGIVDC	334
	*****:*:*:*****:***. *****: .. * :	
HvPTOX1	-----	336
TaPTOX1.a	-----	336
TaPTOX1.b	-----	335
TaPTOX1.c	-----	333
OsPTOX1	VKKSLSKE	336
SiPTOX2	-----	321
SvPTOX2	-----	322
PvPTOX2.b	VKKS LTK--	345
PhPTOX2.a	VKKS LTK--	346
PhPTOX2.b	VKKS LTK--	345
PvPTOX2.a	VKKS LTK--	344
SbPTOX2.a	VKKS LTK--	336
ZmPTOX2.a	VKKS LTK--	339
SbPTOX2.b	VKKS LTK--	351
ZmPTOX2.b	VKKS LTK--	341

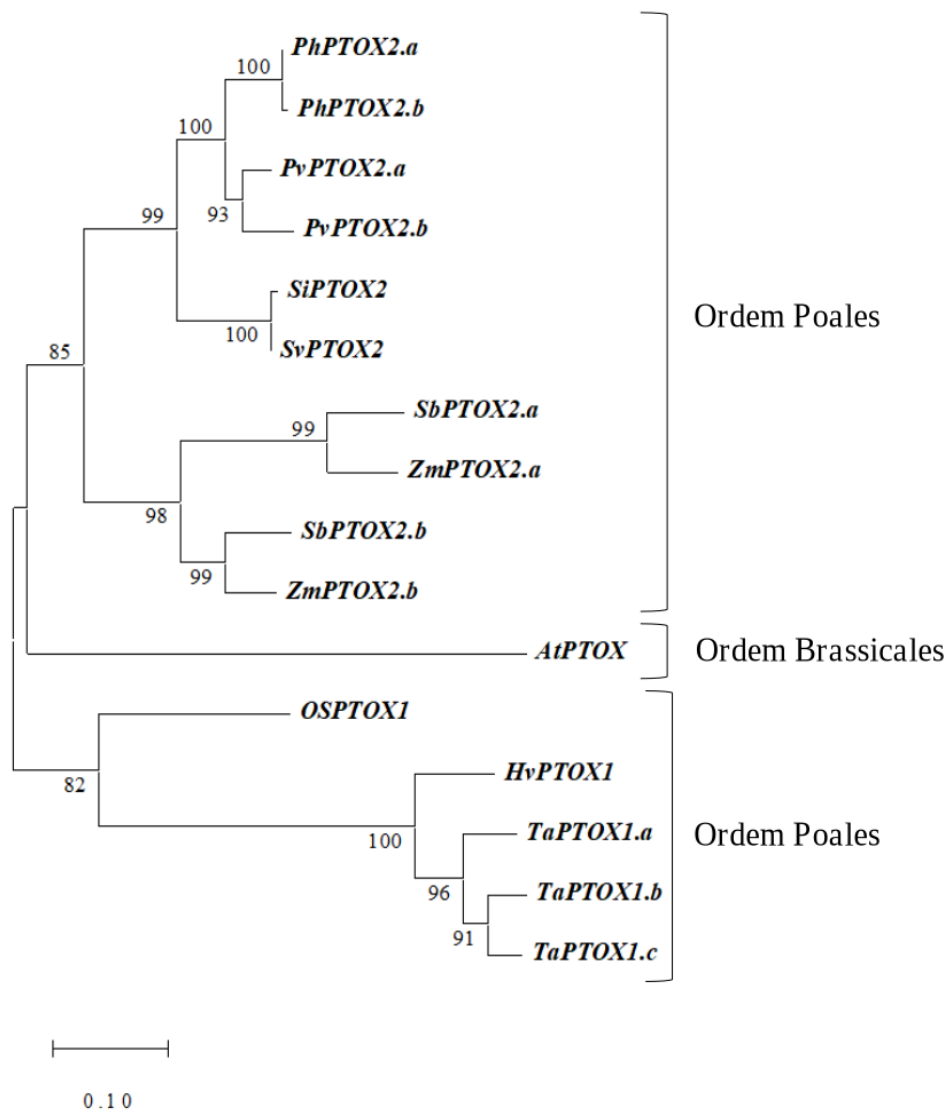
Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

5.4 Alinhamento das sequências e análise das relações filogenéticas entre os genes *PTOX* de gramíneas

Para a construção da árvore filogenética utilizou-se todas as 15 sequências de cDNAs deduzidos das seguintes espécies de monocotiledôneas: *Sorghum bicolor*, *Panicum hallii*, *Panicum virgatum*, *Setaria italica*, *Setaria viridis*, *Zea mays*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare* e *Oryza sativa*. Utilizou-se também a sequência de cDNA pertencente à planta modelo *Arabidopsis thaliana*, muito utilizada em diversas pesquisas de aspectos da biologia molecular de plantas, sendo uma eudicotiledônea pertencente à ordem Brassicales.

Para arquitetar a árvore filogenética fez-se uso de uma ferramenta de análise genética evolutiva molecular, o MEGA 11 (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*). Com isso, a análise filogenética demonstrou que os genes membros da família multigênica *PTOX* de espécies da ordem *Poales* analisadas estão divididos em dois clados de genes ortólogos e são divergentes dos de *Arabidopsis thaliana* da família das Brassicaceae (**Figura 3**). Os clados estão divididos em *PTOX1* e *PTOX2*, assim identificados de acordo com o trabalho de Sousa (2008), para a espécie *Zea mays*. De acordo com a distribuição filogenética propôs-se uma nomenclatura para os genes do sorgo e das demais espécies de gramíneas analisadas, as sequências foram nomeadas de acordo com o clado em que se encontravam, sendo *PTOX1* (1.a, 1.b ou 1.c) e *PTOX2* (2.a ou 2.b) e de acordo com as duas primeiras letras dos nomes de cada espécie, assim, procedeu-se a seguinte nomeação na ordem das *Poales*: Sb - *Sorghum bicolor*, Ph - *Panicum hallii*, Pv - *Panicum virgatum*, Si - *Setaria italica*, Sv - *Setaria viridis*, Zm - *Zea mays*, Ta - *Triticum aestivum*, Hv - *Hordeum vulgare* e Os - *Oryza sativa*.

Figura 3: Análise filogenética dos genes *PTOX* (cDNA deduzidos) das *Poales* e do gene *PTOX* de *Arabidopsis thaliana* (*At.PTOX*) utilizado como grupo externo.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

Ressalta-se que genes ortólogos são genes homólogos que no decorrer da evolução se diferenciam gradualmente mas que, geralmente, conservam a função do gene ancestral, embora possa haver variações dentro do gene a partir do ponto em que as espécies divergiram (PURCENA, 2020). Assim, a realização da análise filogenética nos permite não só compreender a relação de parentesco evolutivo entre as espécies, mas também a ortologia entre os genes estudados, uma vez que isso possibilita inferir e traçar um perfil de expressão em diferentes espécies que possuem ancestralidade em comum.

5.5 Análises das sequências de cDNAs, proteínas e promotores

Por meio do alinhamento das sequências de cDNAs, proteínas e promotores através do programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), foi possível observar o percentual de identidade entre todas as sequências analisadas das espécies *Sorghum bicolor*, *Panicum hallii*, *Panicum virgatum*, *Setaria italica*, *Setaria viridis*, *Zea mays*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare* e *Oryza sativa*.

Os percentuais de identidade obtidos entre as sequências de cDNAs dos quinze genes alinhados foi bastante diversificado (**Tabela 2**). Com relação ao *Sorghum bicolor*, os dois genes observados nesta espécie tiveram maior identidade com os dois genes *PTOX* encontrados no milho, sendo 89,47% entre os genes *SbPTOX2.a* e *ZmPTOX2.a*, e 86,53% entre os genes *SbPTOX2.b* e *ZmPTOX2.b*. Isso se deve ao fato desses genes serem ortólogos, em função da ancestralidade em comum dessas espécies. Quanto as menores identidades constatadas, observou-se um percentual de 62,72% entre os genes *SbPTOX2.b* e *TaPTOX1.b* (*Triticum aestivum*) e 63,79% entre os genes *SbPTOX2.a* e *TaPTOX1.a*.

Tabela 2: Identidade das sequências de cDNAs deduzidas dos genes *PTOX* em *Sorghum bicolor* e outras gramíneas obtidas através do alinhamento no Clustal omega.

	<i>TaPTOX1.c</i>	<i>TaPTOX1.a</i>	<i>HvPTOX1</i>	<i>TaPTOX1.b</i>	<i>OsPTOX1</i>	<i>SiPTOX2</i>	<i>SvPTOX2</i>	<i>PhPTOX2.a</i>	<i>PhPTOX2.b</i>	<i>PvPTOX2.a</i>	<i>PvPTOX2.b</i>	<i>SbPTOX2.a</i>	<i>ZmPTOX2.a</i>	<i>SbPTOX2.b</i>	<i>ZmPTOX2.b</i>
<i>TaPTOX1.c</i>	-	93.65	86.45	88.62	66.52	62.92	63.00	64.23	63.95	65.63	64.49	64.07	66.37	64.35	65.58
<i>TaPTOX1.a</i>	93.65	-	87.03	89.04	66.92	61.83	62.67	63.05	62.85	65.71	63.33	63.79	66.07	63.80	64.39
<i>HvPTOX1</i>	86.45	87.03	-	88.26	68.44	67.29	67.29	68.74	68.58	67.46	67.88	65.44	66.25	65.48	65.69
<i>TaPTOX1.b</i>	88.62	89.04	88.26	-	66.52	63.29	63.29	64.81	64.60	66.12	64.63	63.85	66.69	62.72	64.11
<i>OsPTOX1</i>	66.52	66.92	68.44	66.52	-	71.42	71.18	73.89	73.67	72.63	72.04	71.10	72.78	69.85	73.08
<i>SiPTOX2</i>	62.92	61.83	67.29	63.29	71.42	-	99.47	85.74	85.29	86.11	82.61	75.77	78.27	72.02	73.46
<i>SvPTOX2</i>	63.00	62.67	67.29	63.29	71.18	99.47	-	86.33	85.85	86.29	83.89	75.68	78.24	72.37	74.12
<i>PhPTOX2.a</i>	64.23	63.05	68.74	64.81	73.89	85.74	86.33	-	99.46	92.70	89.25	78.12	79.10	73.56	73.74
<i>PhPTOX2.b</i>	63.95	62.85	68.58	64.60	73.67	85.29	85.85	99.46	-	92.27	88.81	78.01	79.05	73.79	73.90
<i>PvPTOX2.a</i>	65.63	65.71	67.46	66.12	72.63	86.11	86.29	92.70	92.27	-	94.86	77.33	77.93	76.07	76.94
<i>PvPTOX2.b</i>	64.49	63.33	67.88	64.63	72.04	82.61	83.89	89.25	88.81	94.86	-	77.22	78.05	73.10	74.38
<i>SbPTOX2.a</i>	64.07	63.79	65.44	63.85	71.10	75.77	75.68	78.12	78.01	77.33	77.22	-	89.47	81.78	83.52
<i>ZmPTOX2.a</i>	66.37	66.07	66.25	66.69	72.78	78.27	78.24	79.10	79.05	77.93	78.05	89.47	-	83.74	83.95
<i>SbPTOX2.b</i>	64.35	63.80	65.48	62.72	69.85	72.02	72.37	73.56	73.79	76.07	73.10	81.78	83.74	-	86.53
<i>ZmPTOX2.b</i>	65.58	64.39	65.69	64.11	73.08	73.46	74.12	73.74	73.90	76.94	74.38	83.52	83.95	86.53	-

Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

No que concerne aos percentuais obtidos através do alinhamento das sequências de aminoácidos (**Tabela 3**) constatou-se o mesmo resultado do alinhamento dos cDNAs quanto às maiores identidades, ou seja, as duas proteínas do sorgo tiveram maior identidade quando comparadas às do milho, sendo um percentual de 86,87% entre os genes *SbPTOX2.b* e *ZmPTOX2.b* e um percentual de 86,80% entre os genes *SbPTOX2.a* e *ZmPTOX2.a*. Como já mencionado anteriormente, essa alta identidade se deve ao fato de serem espécies muito próximas. No que se refere às menores identidades, constatou-se baixos percentuais entre as proteínas PTOX do sorgo e a proteína PTOX da espécie *Hordeum vulgare*, sendo um percentual de 64,84% entre *SbPTOX2.b* e *HvPTOX1* e de 67,59% entre *SbPTOX2.a* e *HvPTOX1*.

Tabela 3: Identidade das sequências de aminoácidos deduzidas dos genes *PTOX* em *Sorghum bicolor* e outras gramíneas obtidas através do alinhamento no Clustal omega.

	<i>HvPTOX1</i>	<i>TaPTOX1.a</i>	<i>TaPTOX1.b</i>	<i>TaPTOX1.c</i>	<i>OsPTOX1</i>	<i>SiPTOX2</i>	<i>SvPTOX2</i>	<i>PvPTOX2.b</i>	<i>PhPTOX2.a</i>	<i>PhPTOX2.b</i>	<i>PvPTOX2.a</i>	<i>SbPTOX2.b</i>	<i>ZmPTOX2.b</i>	<i>SbPTOX2.a</i>	<i>ZmPTOX2.a</i>
<i>HvPTOX1</i>	-	92.51	93.39	94.26	72.31	69.16	69.58	69.50	68.97	68.55	68.99	64.84	65.81	67.59	66.77
<i>TaPTOX1.a</i>	92.51	-	95.82	95.50	72.82	70.45	70.55	70.75	70.85	70.44	70.57	65.06	65.08	68.00	67.19
<i>TaPTOX1.b</i>	93.39	95.82	-	96.70	73.05	70.13	70.55	70.03	70.75	70.35	70.48	66.24	65.92	68.52	68.35
<i>TaPTOX1.c</i>	94.26	95.50	96.70	-	72.88	69.93	70.36	69.84	69.62	69.21	69.65	65.59	65.61	68.32	67.83
<i>OsPTOX1</i>	72.31	72.82	73.05	72.88	-	81.47	81.53	83.84	85.76	84.85	84.50	77.53	76.80	81.52	79.94
<i>SiPTOX2</i>	69.16	70.45	70.13	69.93	81.47	-	99.69	89.21	91.80	90.85	90.82	80.20	80.07	83.23	81.73
<i>SvPTOX2</i>	69.58	70.55	70.55	70.36	81.53	99.69	-	89.24	91.82	90.88	90.85	80.26	80.13	83.28	81.79
<i>PvPTOX2.b</i>	69.50	70.75	70.03	69.84	83.84	89.21	89.24	-	96.20	95.32	95.92	82.92	81.54	86.09	84.24
<i>PhPTOX2.a</i>	68.97	70.85	70.75	69.62	85.76	91.80	91.82	96.20	-	99.13	98.25	84.62	82.93	86.51	85.29
<i>PhPTOX2.b</i>	68.55	70.44	70.35	69.21	84.85	90.85	90.88	95.32	99.13	-	97.37	84.57	82.87	86.47	84.94
<i>PvPTOX2.a</i>	68.99	70.57	70.48	69.65	84.50	90.82	90.85	95.92	98.25	97.37	-	84.47	82.15	85.50	84.24
<i>SbPTOX2.b</i>	64.84	65.06	66.24	65.59	77.53	80.20	80.26	82.92	84.62	84.57	84.47	-	86.87	82.78	84.10
<i>ZmPTOX2.b</i>	65.81	65.08	65.92	65.61	76.80	80.07	80.13	81.54	82.93	82.87	82.15	86.87	-	83.58	83.38
<i>SbPTOX2.a</i>	67.59	68.00	68.52	68.32	81.52	83.23	83.28	86.09	86.51	86.47	85.50	82.78	83.58	-	86.80
<i>ZmPTOX2.a</i>	66.77	67.19	68.35	67.83	79.94	81.73	81.79	84.24	85.29	84.94	84.24	84.10	83.38	86.80	-

Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

Para a análise das sequências de promotores foi considerada uma região de 1000 pb dos genes *PTOX* do sorgo e das outras gramíneas. No geral, a identidade observada entre as sequências dos promotores foi baixa (**Tabela 4**), o que pode evidenciar possíveis variações no perfil de expressão desses genes (OLIVEIRA, 2015). Diferente dos resultados da análise do alinhamento dos cDNAs e dos aminoácidos, a região promotora de um dos genes do sorgo (*SbPTOX2.b*) não teve maior identidade com a região promotora de um dos genes do milho, mas sim com um dos genes da espécie *Panicum halli*, sendo um percentual de 50,37% entre os genes *SbPTOX2.b* e *PhPTOX2.a*. Já a região promotora do gene *SbPTOX2.a* teve maior identidade com a espécie do milho (*ZmPTOX2.a*), sendo um percentual de 48,57%. As menores identidades observadas para a espécie do sorgo foram constatadas quanto a espécie do arroz (*Oryza sativa*), sendo 30,32% entre os genes *SbPTOX2.b* e *OsPTOX1*, e 31,77% entre os genes *SbPTOX2.a* e *OsPTOX1*.

Tabela 4: Identidade dos promotores dos genes *PTOX* em *Sorghum bicolor* e outras gramíneas obtidas através do alinhamento no Clustal omega.

	<i>ZmPTOX2.b</i>	<i>SbPTOX2.b</i>	<i>SiPTOX2</i>	<i>SvPTOX2</i>	<i>PvPTOX2.b</i>	<i>PvPTOX2.a</i>	<i>PhPTOX2.a</i>	<i>PhPTOX2.b</i>	<i>SbPTOX2.a</i>	<i>ZmPTOX2.a</i>	<i>OsPTOX1</i>	<i>TaPTOX1.b</i>	<i>TaPTOX1.c</i>	<i>HvPTOX1</i>	<i>TaPTOX1.a</i>
<i>ZmPTOX2.b</i>	-	44.92	39.05	39.03	37.08	40.85	40.16	38.37	36.78	34.14	31.09	33.52	35.46	33.52	34.21
<i>SbPTOX2.b</i>	44.92	-	43.39	43.21	44.91	46.22	50.37	48.57	40.05	41.37	30.32	35.81	33.79	35.82	33.52
<i>SiPTOX2</i>	39.05	43.39	-	99.05	46.45	45.65	48.00	47.09	35.11	33.21	31.22	34.08	32.96	31.64	32.62
<i>SvPTOX2</i>	39.03	43.21	99.05	-	47.00	45.95	47.92	47.65	34.84	33.83	31.00	35.11	33.77	32.19	33.21
<i>PvPTOX2.b</i>	37.08	44.91	46.45	47.00	-	58.88	63.62	61.48	37.07	36.49	31.48	33.21	35.08	33.99	31.45
<i>PvPTOX2.a</i>	40.85	46.22	45.65	45.95	58.88	-	67.14	65.61	36.35	36.92	28.82	34.64	33.29	35.17	35.40
<i>PhPTOX2.a</i>	40.16	50.37	48.00	47.92	63.62	67.14	-	95.00	38.07	37.25	31.67	34.79	33.59	35.97	35.72
<i>PhPTOX2.b</i>	38.37	48.57	47.09	47.65	61.48	65.61	95.00	-	38.57	37.15	30.48	35.11	33.89	35.99	35.10
<i>SbPTOX2.a</i>	36.78	40.05	35.11	34.84	37.07	36.35	38.07	38.57	-	48.57	31.77	36.46	35.87	33.29	34.28
<i>ZmPTOX2.a</i>	34.14	41.37	33.21	33.83	36.49	36.92	37.25	37.15	48.57	-	30.13	36.05	35.03	35.28	34.13
<i>OsPTOX1</i>	31.09	30.32	31.22	31.00	31.48	28.82	31.67	30.48	31.77	30.13	-	41.25	41.21	40.44	39.57
<i>TaPTOX1.b</i>	33.52	35.81	34.08	35.11	33.21	34.64	34.79	35.11	36.46	36.05	41.25	-	71.23	56.56	61.34
<i>TaPTOX1.c</i>	35.46	33.79	32.96	33.77	35.08	33.29	33.59	33.89	35.87	35.03	41.21	71.23	-	55.66	61.66
<i>HvPTOX1</i>	33.52	35.82	31.64	32.19	33.99	35.17	35.97	35.99	33.29	35.28	40.44	56.56	55.66	-	75.14
<i>TaPTOX1.a</i>	34.21	33.52	32.62	33.21	31.45	35.40	35.72	35.10	34.28	34.13	39.57	61.34	61.66	75.14	-

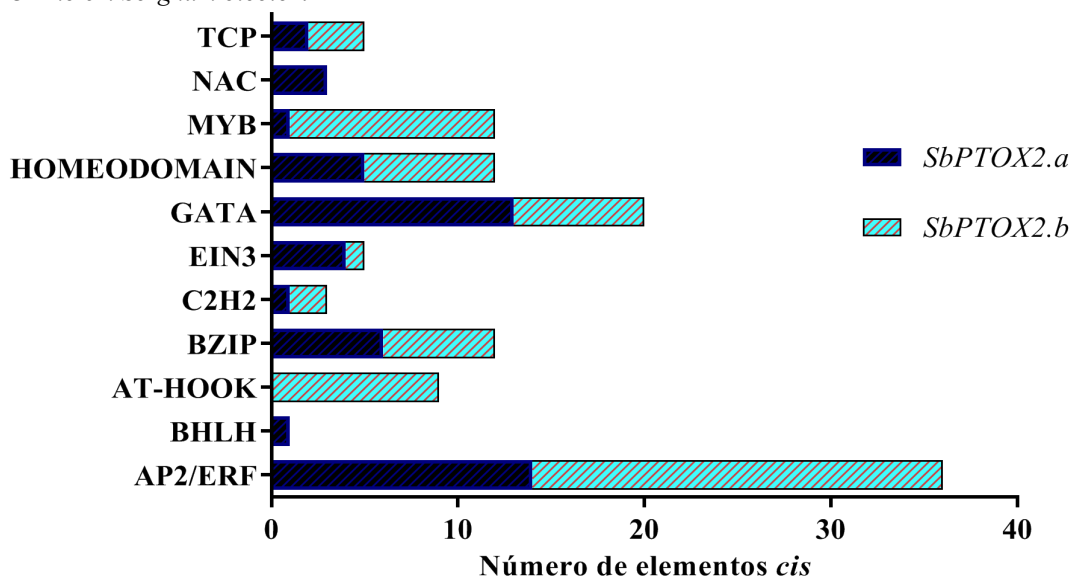
Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

5.6 Análise das regiões promotoras dos genes da *PTOX* em *Sorghum bicolor* (L.) Moench

A análise das regiões dos promotores dos genes da *PTOX* em *Sorghum bicolor* foi feita através de dados disponíveis na ferramenta on-line PlantPAN 3.0 que é um Navegador de Análise de Promotores de Plantas. Por meio dessa ferramenta detectou-se elementos importantes do tipo *cis* que são regulatórios responsivos a estresses ambientais, assim, foi possível realizar uma comparação entre esses elementos e os genes *PTOX* (Figura 4). Vale ressaltar que fatores de transcrição são proteínas que regulam a expressão gênica, determinadas modificações em suas atividades podem ocasionar alterações metabólicas e fenotípicas em resposta a algum estímulo ambiental (WOYANN, 2010).

A presença de possíveis elementos *cis* regulatórios responsivos à estresses foi determinada através de buscas utilizando-se da região de 1000 pares de base (upstream - mais 5') a partir da metionina (códon de início da tradução). A análise das regiões dos promotores dos genes *SbPTOX2.a* e *SbPTOX2.b* do sorgo revelou a presença de alguns fatores de transcrição comuns entres os genes (AP2/ERF, BZIP, C2H2, EIN3, GATA, HOMEODOMAIN, MYB e TCP) e outros específicos de cada um (*SbPTOX2.a* - BHLH e NAC; *SbPTOX2.b* - AT-HOOK).

Figura 4: Análise da presença de elementos *cis* regulatórios presentes nos promotores dos genes *SbPTOX2.a* e *SbPTOX2.b* em *Sorghum bicolor*.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

Dentre as regiões *cis* comuns dos genes *SbPTOX2.a* e *SbPTOX2.b* pode-se identificar: AP2/ERF que são fatores de transcrição capazes de regular diversos processos de desenvolvimento dos vegetais e respostas aos estresses, especialmente os da subfamília ERF,

dado que a sua superexpressão aumenta a tolerância à seca e ao estresse salino, sendo responsivo inclusive a fitormônios como ácido abscísico (ABA) e etileno (ET) (SASAKI *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2022). BZIP que são TFs reguladores essenciais em processos relacionados tanto ao desenvolvimento vegetal (como na formação das folhas e sementes), quanto a respostas a estresses abióticos como a condições de elevada salinidade e seca (HURST, 1995; CORRÊA *et al.*, 2008; WOYANN, 2010). C2H2 que é uma classe de reguladores de transcrição de proteínas de dedos de zinco onde vários membros da família desempenham diversos papéis na resposta a estresses abióticos e sinalização hormonal. Análises do perfil de transcrição revelaram que o nível de transcrição do C2H2 eleva-se sob determinadas condições de estresses abióticos como a salinidade, a seca e o estresse osmótico (MATUK, 2012). EIN3 que é o regulador mestre da via de sinalização de etileno, assim, a transcrição induzida pelo etileno ocorre em ondas temporais reguladas pelo INSENSITIVE3, o que sugere camadas distintas de controle transcricional (CHANG *et al.*, 2013). GATA que são proteínas de ligação de DNA, sendo uma das famílias mais conservadas de fatores de transcrição. Os membros dessa família respondem a vários estresses abióticos como salinidade, seca e ABA (ácido abscísico) (GUPTA *et al.*, 2017). HOMEODOMAIN que é uma espécie de fator de transcrição que desempenha diversos papéis importantes no crescimento e desenvolvimento das plantas, além de responder a vários tipos de estresses abióticos como salinidade, estresse osmótico e ABA (LIU, 2021; LI *et al.*, 2022). MYB (mieloblastose) que faz parte de uma das maiores famílias de fatores de transcrição além de apresentar diversas funções em plantas, incluindo a regulação de respostas a estresses abióticos como seca e salinidade (ROY, 2016; JUANJUAN *et al.*, 2020). TCP que é uma família de fatores de transcrição (TEOSINTE 1, CYCLOIDEA, PCF1) que possuem funções evolutivas conservadas como reguladores em diversas espécies de vegetais, como na planta modelo *Arabidopsis*, além disso esse TF está envolvido tanto no desenvolvimento das plantas como em respostas a estresses abióticos (seca e salinidade). Alguns membros da família TCP participam da síntese hormonal, afetando o desenvolvimento foliar através da interação com genes que fazem parte da biossíntese de metil jasmonato (DANISMAN, 2016; CAMOZATTO, 2021).

No que concerne aos elementos específicos de cada gene pode-se identificar na região promotora do gene *SbPTOX2.a* os seguintes TFs: BHLH que regulam diferentes processos no desenvolvimento das plantas como o crescimento, o metabolismo e as respostas a estresses causados pela seca, salinidade e estresse osmótico (CASTILHOS, 2014). NAC (NAM, ATAF e CUC), que está envolvido no desenvolvimento dos vegetais e nas respostas a estresses

ambientais em casos de estresse salino e hídrico. NAC também está envolvido na regulação da sinalização de hormônios vegetais (WANG, 2013; YUAN, 2019).

Quanto aos elementos específicos do gene *SbPTOX2.b* identificou-se apenas o fator de transcrição AT-HOOK, que está relacionado a funções regulatórias, modificações de histonas e outras funções isoladas da cromatina, estando associado também a respostas a estresses abióticos, sendo que sua superexpressão é identificada sob condições de seca e alto teor de sal (FILARSKY *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2021).

5.7 Análise da expressão *in silico* utilizando dados de RNA-Seq para *Sorghum bicolor* (L.) Moench

As análises de expressão dos genes *PTOX* foram geradas através de dados transcriptômicos (banco SRA) do GenBank para a espécie *Sorghum bicolor* em condições de estresse salino, temperatura elevada e na combinação desses dois estresses. Foram utilizados dois genótipos de sorgo que possuem diferentes graus de tolerância ao estresse salino, sendo os tais, CSF 20 tolerante a salinidade e CSF 18 sensível à salinidade (COSTA *et al.*, 2005). Assim, tendo como base a pesquisa de Saraiva (2017), foram determinados quatro tratamentos experimentais para os cultivares de sorgo em análise, sendo eles, o controle (25 °C + NaCl a 0 mM), a salinidade (25 °C + NaCl a 100 mM), a temperatura elevada (42 °C + NaCl a 0 mM) e o estresse combinado (42 °C + NaCl a 100 mM). A expressão analisada *in silico* foi avaliada apenas em folhas e as condições experimentais do bioprojeto explorado estão detalhados na

Tabela 5.

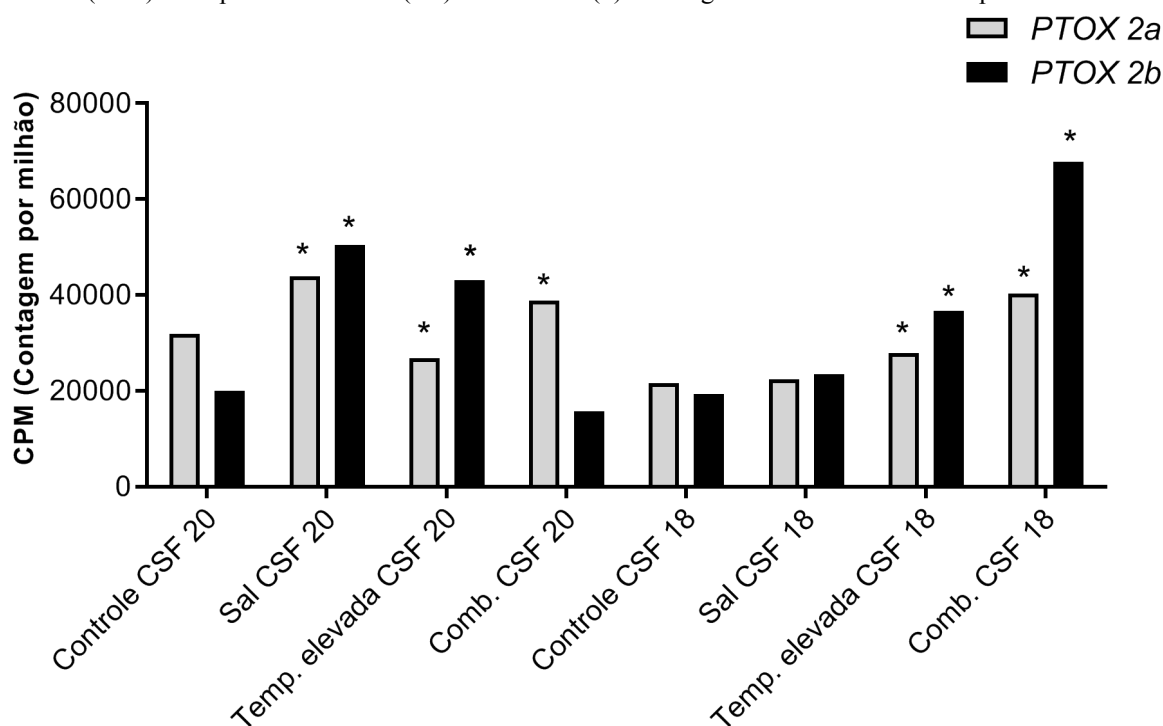
Tabela 5: Experimentos de RNA-seq utilizados para obter o perfil de expressão dos genes *PTOX* em *Sorghum bicolor*.

Genótipos	Tecidos	Tratamento	Detalhes dos experimentos	Replicatas	Referências
CSF 20 e CSF 18	Folhas	Controle e sal	A submissão das plantas ao estresse salino foi iniciada aos 30 DAS (trinta dias após a semeadura), onde foram aplicadas doses de 50 mM de NaCl a cada 24 horas, até atingir a concentração final de 100 mM. A coleta foi feita 12 dias após a submissão ao estresse.	Três	SARAIVA, 2017.
CSF 20 e CSF 18	Folhas	Controle e altas temperaturas	Plantas com 41 DAS passaram por um período de aclimação, onde permaneceram a 25 °C, durante 24 hrs. A temperatura foi elevada gradativamente de 25 °C a 42 °C (5 °C/hora).	Três	SARAIVA, 2017.
CSF 20 e CSF 18	Folhas	Controle e sal + altas temperaturas	As plantas que foram submetidas ao estresse salino por 2 dias passaram pelo processo de aclimação a 25 °C por 24 horas, após esse período a temperatura foi elevada gradativamente para 42 °C.	Três	SARAIVA, 2017.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

Em condições de estresse, o perfil de expressão para *PTOX2a* e *PTOX2b* (**Figura 5**) apresentou comportamento distinto, entretanto, ambos foram regulados positivamente nos genótipos nas três situações de estresse.

Figura 5: Perfil de expressão dos genes *PTOX* nas folhas de plantas de sorgo, genótipos CSF 20 (tolerante à salinidade) e CSF 18 (sensível à salinidade), submetidos a estresses isolados e combinados (COMB.) de salinidade (SAL) e temperatura elevada (TE). O asterisco (*) indica genes diferencialmente expressos.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

Os resultados da expressão dos genes nos respectivos genótipos foram comparados às específicas condições de controle. Na indução do estresse salino no genótipo CSF 20 tanto *PTOX2a* quanto *PTOX2b* apresentaram aumento na expressão em relação ao controle. Tal resultado condiz com a atividade dos fatores de transcrição identificados nos promotores dos genes *SbPTOX2a* e *SbPTOX2b* (**Figura 4**), que apresentam uma grande quantidade de elementos *cis* responsivos a estresses abióticos como a salinidade.

Na indução do estresse por temperatura elevada no genótipo CSF 20 o gene *PTOX2a* apresentou um pequeno declínio na expressão, enquanto o gene *PTOX2b* foi diferencialmente expresso, tendo um aumento na sua atividade. Em estudos realizados por Caverzan (2008) com uma enzima responsiva a diferentes estresses abióticos (APX - Ascorbato Peroxidase) na espécie *Oryza sativa* (arroz) submetida a baixas temperaturas foram constatados aumentos na expressão de alguns membros dessa família multigênica, enquanto outros genes apresentaram reduções após 24 horas sob 10°C. Isso pode indicar que, assim como a família gênica da APX,

os genes *PTOX* são diferencialmente expressos quando se trata de estresses decorrentes de altas ou baixas temperaturas. Além disso, plantas de sorgo do genótipo CSF 20 apresentam respostas efetivas na mitigação dos danos oxidativos causados por estresses decorrentes de altas temperaturas, uma vez que desempenham uma maior atividade transpiratória na tentativa de resfriar os tecidos das plantas (SARAIVA, 2017).

Ainda no genótipo CSF 20, quando combinados ambos os estresses, isto é, salinidade e altas temperaturas, apenas o gene *PTOX2a* apresentou aumento na expressão (não sendo considerada uma diferença estatística relevante), enquanto *PTOX2b* apresentou uma baixa na expressão com relação ao controle. Em análises dos teores de íons das folhas de sorgo submetidas a estresses combinados (sal + temp. elevada) realizadas por Saraiva (2017), pode-se constatar que os mecanismos de controle do acúmulo de Na⁺ das plantas CSF 20 considerados determinantes para a tolerância ao estresse salino, foram ineficazes durante a exposição aos estresses combinados. Esses achados condizem com os dados aqui encontrados, onde é possível perceber que o genótipo 20 é mais eficiente em condições de estresse isolados.

No que diz respeito ao genótipo CSF 18 tanto *PTOX2a* quanto *PTOX2b* apresentaram sutis aumentos na expressão (quando comparados ao controle) frente a estresses induzidos por salinidade, entretanto, não são diferenças significativas estatisticamente. O estresse salino leva a uma menor eficiência fotossintética, o que acarreta na inibição do transporte de elétrons fotossintéticos podendo promover o acúmulo excessivo de EROs que degradam os fotossistemas. Plantas do genótipo CSF 18 apresentam altos níveis de expressão de genes envolvidos no reparo dos fotossistemas I e II, sendo assim, danos causados pelas EROs promovem uma menor eficiência frente a estresses salinos em plantas desse genótipo (SARAIVA, 2017).

Quanto ao estresse induzido por altas temperaturas no genótipo CSF 18, observa-se que o gene *PTOX2a* apresentou um pequeno aumento na expressão (sem diferença relevante), divergindo do gene *PTOX2b*, que evidenciou uma expressão mais significativa. Em consonância com Saraiva (2017) o aparato fotossintético das plantas do sorgo de genótipo CSF18 é suscetível a elevadas temperaturas e capaz de aumentar as taxas transpiratórias para resfriar os tecidos, entretanto, diante desse tipo de estresse não se mostram tão eficientes quanto as plantas do genótipo CSF 20.

Quando combinados tais estresses no genótipo CSF 18, houve aumento significativo da expressão de ambos os genes, mas, em específico o gene *PTOX2b*. Assim, de acordo com os dados obtidos, é possível auferir que o padrão de tolerância de ambos os genótipos frente

aos estresses isolados é diferente do padrão para o estresse combinado. Isso corrobora com os resultados encontrados por Saraiva (2017), que analisou tais estresses (salinidade, temperatura e combinado) nos genótipos CSF 20 e CSF 18 do sorgo, e constatou que plantas do genótipo CSF 20 possuem desempenho mais eficiente quanto aos efeitos deletérios da salinidade e temperatura elevada, entretanto, ao observar tais estresses combinados a situação foi revertida, as plantas do genótipo CSF 18 obtiveram um melhor desempenho frente aos estresses combinados. Em síntese, o genótipo CSF 20 tolerante à salinidade é mais indicado para situações de estresse isolados, enquanto o genótipo sensível a salinidade (CSF 18) é mais indicado para situações de estresse combinados.

Na pesquisa de Saraiva (2017) também foram avaliadas as rotas de transdução por fitohormônios em resposta ao estresse salino, constatando-se que apenas plantas do genótipo tolerante tiveram aumentos na expressão de genes relacionados à sinalização dependente do Ácido Abscísico, visto que, durante as respostas ao estresse salino, este fitohormônio pode ter sinalizado de forma direta e indireta para que houvesse a modulação de diversos processos fisiológicos e metabólicos nas plantas de sorgo em análise. Tais dados condizem com os fatores de transcrição de várias classes encontrados em ambos os genes *PTOX* que podem ser induzidos por fitohormônios como ABA (GATA, ERF e HOMEODOMAIN). A interação com outros hormônios também deve ser estudada, uma vez que diversos genes estão envolvidos nos processos de biossíntese e sinalização do etileno, auxina e ácido salicílico, que apresentam superexpressão frente a estresses induzidos por salinidade (SARAIVA, 2017).

A vista disso, a expressão e a presença de elementos *cis* responsivos à estresses como salinidade e altas temperaturas em regiões promotoras indicam que os genes aqui analisados possuem importantes atribuições frente a condições de estresse. Ademais, é possível perceber que o perfil de expressão dos genes da *PTOX* é relativo ao genótipo e as condições de estresses (isoladas ou combinados) a que são submetidos, o que condiz com os achados de Sousa (2008) para os genes da *PTOX* no milho, onde sugere que essa enzima tem uma regulação diferencial de seus genes nos diferentes tecidos e em diferentes situações de estresse, desse modo, é importante compreender quais condições são mais favoráveis à expressão de tais genes. Além disso, no estudo realizado por Caverzan (2008) no arroz com a família multigênica da APX, observa-se um padrão diferencial de expressão de cada gene dessa família quanto aos diferentes tratamentos e estresses abióticos, o que nos revela que o sistema antioxidante nas plantas é algo muito complexo, que envolve respostas transcricionais, funcionais e metabólicas .

No que concerne a identificação de genes que podem ser utilizados como marcadores

moleculares, isto é como ferramentas biotecnológicas, é possível observar, de acordo com os dados obtidos e apresentados no gráfico (**Figura 5**), que o gene *PTOX2b* apresentou maiores expressões, tais dados coincidem com os encontrados por Sousa (2008) para os genes *PTOX* do milho em situações de estresse osmótico, onde se obteve uma expressão diferencial dos genes intitulados *PTOX1* e *PTOX2* em diferentes tecidos, sendo que o gene *PTOX2* é diferencialmente expresso em folhas de plantas quando submetidas a esse tipo de estresse. Essa expressão diferencial já foi alvo de estudos por Kuntz (2004), que relata a indução da *PTOX* mediante estresses fotooxidativos, tratamentos de sal ou ácido abscísico, mas aponta que a identificação dos principais fatores regulatórios para a expressão da *PTOX* ainda não foi totalmente elucidada.

A atividade diferencial do gene *PTOX2b* em sorgo nos remete que a indução de sua superexpressão pode ser utilizada como ferramenta biotecnológica para aumento da produção e tolerância de cultivares em regiões que predominem salinidade e altas temperaturas, como as regiões áridas e semiáridas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados encontrados neste trabalho foi possível inferir as seguintes considerações:

- A identificação e anotação das sequências gênicas da espécie *Sorghum bicolor* revelou a existência de dois genes *PTOX* aqui nomeados como *SbPTOX2.a* e *SbPTOX2.b*;
- Por meio da análise filogenética das sequências *PTOX* do sorgo e das espécies de gramíneas analisadas foi possível observar que a árvore filogenética se divide em dois clados de genes ortólogos, sendo observado que os genes do sorgo são ortólogos aos do milho. Além disso, essa análise possibilitou a compreensão do parentesco evolutivo entre as espécies e a ortologia entre os genes estudados, abrindo a possibilidade de inferir e traçar um perfil de expressão em diferentes espécies que possuem ancestralidade em comum;
- Através do alinhamento múltiplo das sequências proteicas realizou-se análises dos domínios conservados nas sequências de aminoácidos das proteínas *PTOX*, assim, observou-se alta similaridade e conservação de determinadas regiões em todos os membros dessa família multigênica em todas as espécies analisadas. Esta é uma característica bastante comum entre membros evolutivamente relacionados que compreendem famílias de genes e pertencem ao mesmo compartimento subcelular;
- A análise das regiões dos promotores dos genes da *PTOX* em *Sorghum bicolor* nos permitiu identificar TFs regulatórios responsivos a estresses ambientais, o que nos remete ao perfil de expressão dos genes *SbPTOX2a* e *SbPTOX2b*, que apresentaram comportamento distinto mas foram regulados positivamente nos genótipos utilizados nas situações de estresse induzido;
- Através de análises do perfil de expressão foi possível deduzir que o genótipo CSF 20 tolerante à salinidade é mais indicado para situações de estresse isolados e o genótipo sensível a salinidade (CSF 18) é mais indicado para situações de estresse combinados;
- A presença de TFs responsivos a estresses abióticos nas regiões promotoras sinalizam que os genes aqui analisados desempenham importantes funções em condições de

estresse. Assim, percebe-se que o estudo das funções fisiológicas de fatores de transcrição na regulação de rotas de defesa a estresses ambientais oferece oportunidades para a engenharia genética e o desenvolvimento de culturas mais tolerantes;

- Ademais, o perfil de expressão dos genes da *PTOX* demonstrou ser relativo ao genótipo e as condições de estresse, sendo importante compreender quais condições são mais favoráveis à expressão de tais genes. Observou-se que gene *PTOX2b* apresentou maiores expressões frente aos tipos de estresse aqui estudados, o que pode levar a indicá-lo como provável gene alvo para o melhoramento genético.

REFERÊNCIAS

- ANDREWS, S. A quality control tool for high throughput sequence data. **FastQC**, 2010. Disponível em: <http://www.bioinformaticsbabraham.ac.uk/projects/fastqc>. Acesso em 22 abr. 22.
- ANDERS, S.; PYL, P. T.; HUBER, W. HTSeq: a Python framework to work with high throughput sequencing data. **Bioinformatics**, v. 31, p. 166-169, 2015.
- BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 57, n. 1, p. 289–300, 1995.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/30/15/2114/2390096>. Acesso em 22 abr. 22.
- BORGES, D. **Vantagens do Sorgo na Alimentação de Aves** - UFU. 2019. Disponível: <http://www.comunica.ufu.br/noticia/2019/02/pesquisa-da-ufu-demonstra-vantagens-do-sorgo-na-alimentacao-de-aves>. Acesso em: 22 abr. 22.
- CAMOZATTO, G. H. **Caracterização de fatores de transcrição TEOSINTE BRANCHED 1, CYCLOIDEA e PCF1 (TCP) em Fragaria x ananassa**. 2021. 48 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.
- CAMPOS, M. D. *et al.* Isolation and characterization of plastid terminal oxidase gene from carrot and its relation to carotenoid accumulation. **Plant Gene**, v. 5, p. 13-21, 2016. ISSN 2352-4073. doi.org/10.1016/j.plgene.2015.10.005.
- CAROL, P.; KUNTZ, M. A plastid terminal oxidase comes to light: implications for carotenoid biosynthesis and chlororespiration. **Trends In Plant Science**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.31-36, 2001.
- CASTILHOS, G. **O papel dos fatores de transcrição bHLH162 e bHLH63 na adaptação das plantas ao estresse hídrico e ao ataque do fungo Phakopsora pachyrhizi**. 2014. 73 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.
- CHANG, K. N. *et al.* A resposta transcricional temporal ao gás etileno impulsiona a regulação cruzada do hormônio do crescimento em Arabidopsis. **eLife**, 2013.
- CHEN, Y. A.; WEN, Y. C.; CHANG, W. C. AtPAN: an integrated system for reconstructing transcriptional regulatory networks in Arabidopsis thaliana. **BMC genomics**, v. 13, p. 85, 2012.
- CAVERZAN, A. **Caracterização funcional dos genes de ascorbato peroxidase de arroz (Oryza sativa L.) nas interações entre estresse oxidativo e estresses abióticos**. 2008. 91 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

COSTA, J. H.; MCDONALD, A. E.; ARNHOLDT-SCHMITT, B.; MELO, D. F. A classification scheme for alternative oxidases reveals the taxonomic distribution and evolutionary history of the enzyme in angiosperms. **Mitochondrion**, [s.l.], v. 19, p.172-183, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24751423>. Acesso em: 22 abr. 22.

COSTA, P. H. A. *et al.* Antioxidant-enzymatic system of two sorghum genotypes differing in salt tolerance. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, p. 353-362, 2005.

CORRÊA, L. G. *et al.* The role of bZIP transcription factors in green plant evolution: adaptive features emerging from four founder genes. **PloS one**, v. 3, n. 8, p. 2944, 2008. doi.org/10.1371/journal.pone.0002944.

DANISMAN, S. Fatores de transcrição do TCP na interface entre desafios ambientais e respostas de crescimento da planta. **Plant Sci**, 2016. doi.org/10.3389/fpls.2016.01930.

DIA RURAL. **Entenda mais sobre o sorgo, cada vez mais frequente nas terras produtivas do Brasil**. 2021. Disponível em: <https://agropos.com.br/sorgo/>. Acesso em: 15 abr. 22.

EMBRAPA MILHO E SORGO. **Cultivo do Sorgo**. 2015. Disponível em:< Cultivo do Sorgo (embrapa.br)>. Acesso em 14 abr. 22.

FILARSKY, M. *et al.* The extended AT-hook is a novel RNA binding motif. **RNA biology**, v. 12, n. 8, p. 864-876, 2015.

FU, A.; PARK, S.; RODERMEL, S. Sequências necessárias para a atividade de PTOX (IMMUTANS), um terminal plastid oxidase: *in vitro* e em banana mutagênese de locais de ligação de ferro e uma sequência conservada que corresponde ao Exon 8. **J Biol Chem**, 2005. doi: 10.1074/jbc. M508940200.

GOUVEIA , S. S.; LIMA, A. A. **Relação entre espécies reativas de oxigênio e a promoção carcinogênica**. Universidade Regional da Bahia - UNIRB, v. 20, n.3, p.174-179, 2017.

GUPTA, P. *et al.* Tensões abióticas causam regulação diferencial das formas alternativas de emenda do fator de transcrição de GATA no arroz. **Front Plant Sci**, 2017. doi:10.3389/fpls.2017.01944.

HIGO, K.; UGAWA, Y.; IWAMOTO, M.; KORENAGA, T. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. **Nucleic acids research**, v. 27, p. 297-300, 1999.

HU, B. *et al.* GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. **Bioinformatics**, 2015. doi.org/10.1093/bioinformatics/btu817

HURST, H. C. Transcription factors 1: bZIP proteins. **Protein profile**, v. 2, n. 2, p. 101-168, 1995.

IBÁÑEZ, H. *et al.* Chlororespiration and tolerance to drought, heat and high illumination. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, n. 9, p. 732–738, 2010.

JARDIM, A. M. D. R. F. *et al.* Production potential of Sorghum bicolor (L.) Moench crop in the Brazilian semiarid. **PUBVET**, v. 14, No. 04, p. 141, 2020. doi:10.31533/pubvet.v14n4a550.1-13

JUANJUAN, L. *et al.* Genome-wide identification of MYB genes and expression analysis under different biotic and abiotic stresses in Helianthus annuus L. **Industrial Crops and Products**, v. 143, 2020. ISSN 0926-6690. doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111924.

KIM, D.; PERTEA, G.; TRAPNELL, C.; PIMENTEL, H.; KELLEY, R.; SALZBERG, S. L. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. **Genome Biology**, v. 14, n. 4, 2013.

KUNTZ, M. Oxidase Terminal do Plastídeo e seu significado biológico. **Planta**, [s.l.], v. 218, n. 6, p.896-899, 2004. doi: 10.1007/s00425-004-1217-6.

KUMAR, P.; TOKAS, J.; SINGAL, H. R. Amelioration of Chromium VI Toxicity in Sorghum (Sorghum bicolor L.) usando Glicina Betaine. **Sci Rep**. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52479-w>. Acesso em: 10 out. 22.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, v. 9, n. 4, p. 357-359, 2012.

LAUREAU, C. *et al.* Plastid terminal oxidase (PTOX) has the potential to act as a safety valve for excess excitation energy in the alpine plant species Ranunculus glacialis L. **Plant Cell Environ**, v. 36, p.1296–1310, 2013. doi: 10.1111/pce.12059.

LESCOT, M. *et al.* PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. **Nucleic acids research**, v. 30, p. 325-327, 2002. doi.org/10.1093/nar/30.1.325.

LEMOS, M. S. **Análise filogenética da família multigênica da catalase em angiospermas e expressão in silico na espécie zea mays**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, p. 91. 2019.

LENNON, A. M.; PROMMEENATE, P.; NIXON, P. J. Location, expression and orientation of the putative chlororespiratory enzymes, ndh and immutans, in higher-plant plastids. **Planta**, v. 218, p.254–260, 2003. doi: 10.1007/s00425-003-1111-7.

LIMA, K. T. L. **Polimorfismos do gene da plastoquinol oxidase (PTOX) em ecótipos de Arabidopsis thaliana (projeto 1001 genomas): correlações de expressão gênica e de variantes estruturais da proteína com a distribuição geográfica dos ecótipos**. 2017. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2017.

LIU, H.; YANG Y.; ZHANG L. **Zinc Finger-Homeodomain Transcriptional Factors (ZF-HDs) in Wheat (Triticum aestivum L.): Identificação, Evolução, Análise de Expressão e Resposta a Estresses Abióticos**. Plantas (Basileia), 2021. doi: 10.3390/plantas10030593.

LI, J. *et al.* Genome-wide investigation of bHLH genes and expression analysis under different biotic and abiotic stresses in Helianthus annuus L. **International Journal of**

Biological Macromolecules, v. 189, p.72-83, 2021. ISSN 0141-8130.
doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.072.

LI, X. *et al.* Identificação e caracterização de fatores de transcrição do zíper de leucina homeodómina responsivos em *Medicago truncatula*. **Mol Biol Rep**, v. 49, p.3569-3581, 2022.
doi.org/10.1007/s11033-022-07197-4.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome biology**, v. 15, n. 12, p. 550, 2014.
doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8.

MATUK, A. K. Involvement of plant C2H2-type zinc finger transcription factors in stress responses. **Plant Science**, v. 185–186, 2012, p. 78-85, ISSN 0168-9452.
doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.11.015.

MAIA, R. A. **Genes duplicados da oxidase terminal do plastídio (PTOX) em soja [Glycine max (L.) Merrill]:** caracterização, expressão e afinidade das isoformas proteicas pelo ligante. 2018. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

MALISZEWSKI, Eliza. **O que você precisa saber sobre o sorgo:** cereal é o quinto mais cultivado no mundo e tem diversos usos, sendo opção na safrinha. AgroLink, 2021.

Disponível em:

<https://www.agrolink.com.br/noticias/o-que-voce-precisa-saber-sobre-o-sorgo_445721.html>. Acesso em: 01 dez. 2022.

MCDONALD, A. E.; IVANOV, A. G.; BODE, R.; MAXWELL, D. P.; RODERMEL, S. R.; HÜNER, N. P.A. Flexibility in photosynthetic electron transport: The physiological role of plastoquinol terminal oxidase (PTOX). **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Bioenergetics**, [s.l.], v. 1807, n. 8, p.954-967, 2011.

NAWROCKI, W. *et al.* The Plastid Terminal Oxidase: Its Elusive Function Points to Multiple Contributions to Plastid Physiology. **Annual Review Of Plant Biology**, [s.l.], v. 66, n. 1, p.49-74, 2015.

OLIVEIRA, A. E. R. **Perfil de expressão e análise filogenética dos genes da proteína desacopladora mitocondrial durante o desenvolvimento e estresse em soja [Glycine max (L.) Merr.]**. 2015. 185 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2015.

PETERSEN, T. M. Para que serve o sorgo? Grão sem glúten pode substituir milho e trigo. **Globo Rural**, 2022. Disponível em:

<https://globorural.globo.com/Noticias/Agricultura/noticia/2022/09/para-que-serve-o-sorgo-gra-o-sem-gluten-pode-substituir-milho-e-trigo.html>. Acesso em: 19 Out. 22.

PURCENA, T. V. **Uso de grupos ortólogos e busca por ilhas de patogenicidade na identificação de três espécies de bacillus**. Artigo (Bacharel em Biomedicina)- Centro Universitário de Brasília (UniCEUB). Brasília, 2020.

- ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, p. 139-140, 2010. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/26/1/139/182458>. Acesso em: 22 abr. 22. doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616.
- ROY, S. Function of MYB domain transcription factors in abiotic stress and epigenetic control of stress response in plant genome. **Plant signaling & behavior**, v. 11, n. 1, 2016.
- SANTOS, M. J. Estresse Oxidativo. **Contexto e Saúde**, Editora Unijuí. Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde, v. 20, n. 39, 2020.
- SARAIVA, K. D. C. **Respostas moleculares e fisiológicas envolvidas com tolerância a estresses isolados e combinados de salinidade e temperatura elevada em dois genótipos de Sorghum bicolor(L) Moench**. 2017. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, p. 385, 2017.
- SAITOU N.; NEI, M. The Neighbor-Joining method-a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol**, v. 4, 1987. Disponível em: <https://academic.oup.com/mbe/article/4/4/406/1029664>. Acesso em: 22 abr. 22. doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
- SASAKI, K. *et al.* Two novel AP2/ERF domain proteins interact with cis-element VWRE for wound-induced expression of the Tobacco tpoxN1 gene. **The Plant Journal**, v. 50, n. 6, p. 1079-1092, 2007.
- SCIENCE. A diferença entre genes ortólogos e parálogos. **Portal Multimídia Científico e Popular**. 2022. Disponível em: <https://pt.science19.com/difference-between-orthologous-paralogous-genes-12510>. Acesso em: 19 out. 2022.
- SOLANO, C. S. **Avaliação agroeconômica de quatro cultivares de sorgo sacarino (sorghum bicolor (L) moench) para produção de etanol em campos dos goytacazes**. 2016. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes – RJ, p. 141. 2016. Acesso em: 14 abr. 22.
- SOUSA, F. Y. M. **Caracterização bioquímica e molecular da oxidase terminal da plastoquinona (PTOX) em Zea mays**. 2008. 73 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.
- SOUZA, R. J.; RIBEIRO, N. B. Estresses Abióticos, como conviver com eles? **Pesquisa e Desenvolvimento**, 2015. Disponível: https://www.agrolink.com.br/colunistas/estresses-abioticos--como-conviver-com-eles--_387950.html. Acesso em: 22 abr. 22.
- SUN, X.; WEN, T. Physiological roles of plastid terminal oxidase in plant stress responses. **J. Biosci**, v. 36, p. 951–956, 2011. doi: 10.1007/s12038-011-9161-7.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary

distance, and maximum parsimony methods. **Mol Biol Evol**, v. 28, 2011. doi:10.1093/molbev/msr121.

TAVARES, F. **História Milenar: Especial Sorgo**. 2016. Disponível em: <https://diarioverde.com.br/historia-milenar>. Acesso em: 17 ago. 2022.

WANG, D.; FU, A. The plastid terminal oxidase is a key factor balancing the redox state of thylakoid membrane. **Enzymes**, v. 40, p. 143–171, 2016. doi: 10.1016/bs.enz.2016.09.002.

WANG, Y. *et al.* Overexpression of a tomato AP2/ERF transcription factor SlERF.B1 increases sensitivity to salt and drought stresses. **Scientia Horticulturae**, v. 304, 2022. ISSN 0304-4238. doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111332.

WANG, Z.; DANE, F. NAC (NAM/ATAF/CUC) fatores de transcrição em diferentes estresses e seu caminho de sinalização. **Acta Physiol Plant**, v. 35, p. 1397-1408, 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11738-012-1195-4>. Acesso em: 10 out. 22. doi: 10.1007/s11738-012-1195-4.

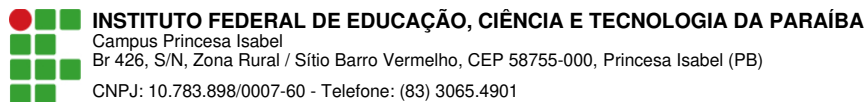
WOYANN, L. G. **Identificação de genes regulados por fatores de transcrição da família bzip super expressos em resposta à toxidez por ferro em arroz**. In: VII CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 2010, online. Balneário Camboriú: SOSBAI, 2010, p. 85-88.

YUAN, X; WANG, H.; CAI, J. *et al.* Fatores de transcrição do NAC na imunidade vegetal. **Phytopathol Res** v. 1, p. 3, 2019. doi.org/10.1186/s42483-018-0008-0

ZHANG, W-M. Insights Into the Molecular Evolution of AT-Hook Motif Nuclear Localization Genes in Brassica napus. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 2021. ISSN 1664-462X. doi 10.3389/fpls.2021.714305.

ZANDALINAS, S.; BALFAGÓN, D.; ARBONA, V.; GÓMEZ-CADENAS, A. **Modulation of Antioxidant Defense System Is Associated with Combined Drought and Heat Stress Tolerance in Citrus**. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 8, p.1-10, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28638395>. Acesso em: 15 abr. 22.

ZIMIN, A. V. *et al.* The first near-complete assembly of the hexaploid bread wheat genome, *Triticum aestivum*. **GigaScience**, v. 6, n. 11, 2017. doi 10.1093/gigascience/gix097.



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA PARAÍBA

Campus Princesa Isabel

Br 426, S/N, Zona Rural / Sítio Barro Vermelho, CEP 58755-000, Princesa Isabel (PB)

CNPJ: 10.783.898/0007-60 - Telefone: (83) 3065.4901

Documento Digitalizado Restrito

TCC

Assunto: TCC
Assinado por: Iara Silva
Tipo do Documento: Anexo
Situação: Finalizado
Nível de Acesso: Restrito
Hipótese Legal: Informação Pessoal (Art. 31 da Lei no 12.527/2011)
Tipo do Conferência: Cópia Simples

Documento assinado eletronicamente por:

- Iara Carolina Ferreira da Silva, ALUNO (201914020002) DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CAMPUS PRINCESA ISABEL, em 07/08/2023 18:30:49.

Este documento foi armazenado no SUAP em 07/08/2023. Para comprovar sua integridade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifpb.edu.br/verificar-documento-externo/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 899640
Código de Autenticação: f37db13d2d

