



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

LYNDEFANIA MELO DE SOUSA

**CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA / ESTRUTURAL DA FAMÍLIA
MULTIGÊNICA DA H⁺-ATPase DE MEMBRANA PLASMÁTICA EM
MONOCOTILEDÔNEAS E ANÁLISE FUNCIONAL EM *Zea mays***

FORTALEZA

2019

LYNDEFANIA MELO DE SOUSA

CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA / ESTRUTURAL DA FAMÍLIA MULTIGÊNICA
DA H⁺ -ATPase DE MEMBRANA PLASMÁTICA EM MONOCOTILEDÔNEAS E
ANÁLISE FUNCIONAL EM *Zea mays*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica vegetal.

Orientador: Prof. Dr. José Hélio Costa.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S697c Sousa, Lyndefania Melo de.

Caracterização filogenética / estrutural da família multigênica da h⁺-atpase de membrana plasmática em monocotiledôneas e análise funcional em *zea mays* / Lyndefania Melo de Sousa. – 2019.
68 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. José Hélio Costa.

1. Anotação gênica. 2. Caracterização gênica. 3. Distribuição filogenética. I. Título.

CDD 572

LYNDEFANIA MELO DE SOUSA

CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA / ESTRUTURAL DA FAMÍLIA MULTIGÊNICA
DA H⁺ -ATPase DE MEMBRANA PLASMÁTICA EM MONOCOTILEDÔNEAS E
ANÁLISE FUNCIONAL EM *Zea mays*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Bioquímica.
Área de concentração: Bioquímica vegetal

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Hélio Costa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Rafael de Souza Miranda
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Prof(a). Dr^a. Kátia Daniella Cruz Saraiva
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba (IFPB)

A Deus.

À minha filha Camilla e aos meus pais,
Liduína e Assis.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e força para realização do presente trabalho.

A minha filha Camilla por ser minha inspiração, em quem eu penso quando as dificuldades surgem e que me dá ânimo para seguir em frente. Aos meus pais Liduína e Assis que sempre me apoiaram e me ajudaram, além dos vários sacrifícios que fizeram para que eu pudesse dar continuidade aos meus estudos. A todos os demais membros da minha família que sempre me incentivaram e ajudaram.

A Universidade Federal do Ceará e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica pelo apoio institucional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento do presente trabalho.

Ao Prof. Dr. José Hélio Costa pela orientação e os ensinamentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Rafael de Souza Miranda, por quem tenho profundo respeito e admiração, por seus ensinamentos, companheirismo e disponibilidade em ajudar, desde a época da graduação. Por ter me apresentado a bomba de prótons H^+ -ATPase MP principal objeto de estudo do presente trabalho e por sua disponibilidade em participar da minha banca examinadora.

A Prof(a). Dra. Kátia Daniella da Cruz Saraiva por ter aceitado participar da minha banca examinadora e pela ajuda durante o processo de classificação filogenética da bomba de prótons H^+ -ATPase MP, além dos demais ensinamentos prestados durante a realização do presente estudo.

Ao Prof. Dr. Enéas Gomes Filho e ao Fabrício Eulálio por gentilmente aceitarem compor a minha banca examinadora (suplentes).

Ao João Pedro pela sua boa disposição em me ajudar durante os anos de mestrado, além da amizade e companheirismo. Ao Clesivan e a Thais que acompanharam de perto o desenvolvimento do presente trabalho, e sempre estiveram dispostos a orientar, ensinar, corrigir, discutir os diferentes temas relacionados ao presente estudo, além do apoio e amizade (vocês foram fundamentais na realização desse trabalho). Ao André Luiz, por pacientemente me ensinar o processo de anotação manual dos genes, além do incentivo e da amizade. A Moaciria por toda a ajuda, amizade e pelos momentos de descontração. Ao Edson e o Matheus que me auxiliaram nas análises *in silico* da expressão dos genes. Aos meus demais colegas de Laboratório: Rachel, Dayane, Mathias, Susan, Beatriz e Thalita pelo bom convívio e amizade. Aos meus queridos amigos do Laboratório de Fisiologia Vegetal, Stellamaris, Daniel, Gyedre e Cibelle que sempre me apoiaram e sempre estiveram dispostos a esclarecer minhas dúvidas

e pelas orientações prestadas em diversos momentos durante a realização do presente trabalho.

Aos demais colegas do programa de Pós-Graduação em Bioquímica pelo bom convívio e amizade. E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

As plantas estão continuamente expostas a mudanças ambientais que podem ser desfavoráveis ao seu crescimento e desenvolvimento. Entretanto, elas desenvolveram ao longo do tempo mecanismos de tolerância a essas condições adversas. Dentre eles, a presença das bombas de prótons H^+ -ATPase de membrana plasmática (MP) que realizam o bombeamento de prótons do citoplasma para o ambiente extracelular, bem como atuam na regulação do pH intracelular e na manutenção da homeostase iônica. Essas bombas de prótons são codificadas por uma família multigênica apresentando, aproximadamente, onze genes em espécies vegetais. No entanto, estudos sobre sua caracterização gênica e funcional são limitados, de forma que a distribuição e função de cada membro gênico ainda não são bem compreendidas. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi analisar a distribuição filogenética e estrutural da família multigênica H^+ -ATPase MP em monocotiledôneas e avaliar *in silico* o perfil de expressão desses genes em *Zea mays* durante o desenvolvimento e em condições de estresse. Para isto, os membros gênicos foram identificados e anotados através de buscas em bancos de genomas disponíveis no NCBI e *Phytozome*, utilizando a ferramenta BLAST. As sequências gênicas e de cDNAs foram usadas para avaliar a estrutura de éxon/íntrons através da ferramenta *Gene Structure Display Server*. Posteriormente, as sequências protéicas deduzidas foram submetidas ao programa MEGA 7.0 para a inferência da distribuição filogenética. O perfil de expressão dos genes foi verificado através da análise de experimentos de sequenciamento de RNA (RNA-seq) em plantas de milho depositados no banco *Sequence Read Archive* (SRA - NCBI). Os resultados revelaram que a H^+ -ATPase MP pode ser codificada por uma família de 5 a 18 genes a depender da espécie. Esses genes foram distribuídos em cinco clados distintos nomeados de I-V, onde foram identificadas similaridades quanto à estrutura de exons/íntrons presentes nos genes agrupados em cada clado. Além disso, a análise de expressão *in silico* revelou que a maioria dos membros gênicos foram constitutivamente expressos em milho e alguns membros foram responsivos a condições de estresse, tais como, infecção por patógeno, submersão, deficiência hídrica e altas concentrações de nitrato. Os genes agrupados no clado I, em sua maioria, foram regulados negativamente, enquanto, que a maioria dos genes agrupados nos clados II e IV foram regulados positivamente. Contudo, o gene agrupado no clado V não foi responsivo a nenhuma das condições. O padrão de expressão nos tecidos durante o desenvolvimento, revelou que os genes pertencentes ao clado IV (*ZmPHA4* e *ZmPHA4a*) foram predominantemente expressos nos tecidos do pólen, enquanto que os demais genes apresentaram expressão variável a depender do tecido analisado. No geral, esses

dados dão suporte para compreender a distribuição filogenética, estrutura gênica e o padrão de expressão de membros gênicos em tecidos durante o desenvolvimento e sob condições ambientais específicas, possibilitando propor uma classificação de H⁺-ATPases MP em monocotiledôneas.

Palavras-chave: Anotação gênica. Caracterização gênica. Distribuição filogenética.

ABSTRACT

Plants are continually exposed to environmental changes that may be unfavorable to their growth and development. However, they have developed over time mechanisms of tolerance to these adverse conditions. Among them, the presence of plasma membrane H^+ -ATPase (MP) proton pumps that perform the pumping of protons from the cytoplasm to the extracellular environment, as well as the regulation of intracellular pH and the maintenance of ionic homeostasis. The proton pumps are encoded by a multigenic family displaying approximately eleven genes in plant species. However, studies on its gene and functional characterization are limited, so that the distribution and function of each gene member are still not well understood. Thus, the aim of this work was to analyze the phylogenetic and structural distribution of the multigenic H^+ -ATPase MP in monocotyledons and evaluate *in silico* the expression profile of these genes in *Zea mays* during development and under stress conditions. For this, the gene members were identified and annotated through searches in genomes databases available in NCBI and Phytozome, using the BLAST tool. Afterwards, Gene and cDNA sequences were used to evaluate the structure of exons / introns through the Gene Structure Display Server tool. Subsequently, the deduced protein sequences were submitted to the MEGA 7.0 program for phylogenetic distribution inference. The expression profile of the genes was verified by the analysis of RNA sequencing experiments (RNA-seq) in corn plants deposited in the Sequence Read Archive (SRA-NCBI). The results revealed that H^+ -ATPase MP can be encoded by a family of 5 to 18 genes depending on the species. These genes were distributed in five distinct clades named I-V, where similarities were identified regarding the structure of exons / introns present in genes clustered in each clade. In addition, *in silico* expression analysis revealed that most of the gene members were constitutively expressed in maize and some members were responsive to stress conditions such as pathogen infection, submersion, water deficiency and high nitrate concentrations. The genes clustered in clade I, for the most part, were downregulated, whereas, the majority of genes clustered in clades II and IV were upregulated. However, the gene clustered in clade V was not responsive to any of the conditions. The pattern of expression in the tissues during development revealed that genes belonging to clade IV (*ZmPHA4* and *ZmPHA4a*) were predominantly expressed in pollen tissues, while the other genes presented variable expression depending on the tissue analyzed. In general, these data support the understanding of the phylogenetic distribution, gene structure and pattern of gene expression in tissues during development and under specific environmental conditions, making it possible to propose a classification of H^+ -ATPases MP in monocotyledons.

Keywords: Gene annotation. Gene characterization. Phylogenetic distribution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –Árvore filogenética das ATPases do tipo P.....	15
Figura 2 –Estrutura primária da H ⁺ -ATPase MP em <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
Figura 3 –Ciclo de reação da H ⁺ -ATPase de membrana plasmática	19
Figura 4 –Análise filogenética da H ⁺ -ATPase MP.....	35
Figura 5 –Perfil da expressão diferencial dos genes da H ⁺ -ATPase MP em diferentes tipos de estresse.....	38
Figura 6 –Expressão dos genes da H ⁺ -ATPase MP nos tecidos do grão germinado, folha madura, espiga, córtex, pólen, estilo-estigma e internódio em <i>Zea mays</i> .	41
Figura 7 –Expressão dos genes da H ⁺ -ATPase nos tecido da plântula, pólen, óvulo e saco embrionário em <i>Zea mays</i>	43
Figura 8 –Números dos elementos <i>Cis</i> regulatórios.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Experimentos de RNA seq utilizados para obter o perfil de expressão dos genes da H ⁺ -ATPase em <i>Zea mays</i>	28
Tabela 2 – Caracterização dos genes da H ⁺ -ATPase de membrana plasmática.....	33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	H⁺ -ATPase de membrana plasmática.....	16
1.2	Papel fisiológico das H⁺ -ATPases de membrana plasmática em plantas.....	19
1.3	O papel das H⁺ -ATPase MP em plantas submetidas a estresses ambientais.....	20
2	OBJETIVOS.....	24
2.1	Objetivo geral	24
2.2	Objetivos específicos.....	24
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	Identificação e caracterização dos genes da família multigênica H⁺ -ATPase de membrana plasmática.....	25
3.2	Configuração dos éxons/íntrons dos genes da família H⁺ -ATPase de membrana plasmática em monocotiledôneas.....	26
3.3	Alinhamento de sequências e análise filogenética.....	26
3.4	Análise <i>in silico</i> da expressão gênica da H⁺ -ATPase de membrana plasmática via RNAseq.....	26
3.5	Análise da região promotora.....	31
3.6	Análise estatística.....	31
4	RESULTADOS.....	32
4.1	Identificação, anotação e caracterização dos genes da H⁺ -ATPase de membrana plasmática.....	32
4.2	Análise das relações filogenéticas entre os genes da bomba de próton H⁺ -ATPase de membrana plasmática.....	34
4.3	Expressão <i>in silico</i> dos genes da H⁺ -ATPase de membrana plasmática em <i>Zea mays</i>.....	36
4.3.1	<i>Expressão in silico dos genes da H⁺ -ATPase de membrana plasmática submetidos a condições de estresse.....</i>	36
4.3.2	<i>Expressão in silico dos genes da H⁺ -ATPase de membrana plasmática em diferentes tecidos durante o desenvolvimento.....</i>	39
4.4	Análise da região promotora.....	45
5	DISCUSSÃO.....	47

6	CONCLUSÃO.....	56
	REFERÊNCIAS	57
	ANEXO A – CONFIGURAÇÃO ÉXON/INTRON DOS GENES DA H⁺ - ATPase DE MEMBRANA PLASMÁTICA, DE ACORDO COM OS CLADOS FORMADOS NA ÁRVORE FILOGENÉTICA.....	64

1 INTRODUÇÃO

As adenosinatrifosfatases (ATPases) formam uma classe de proteínas que atuam na catálise do trifosfato de adenosina (ATP), gerando uma adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico (P_i), podendo também ser observada a ocorrência da reação inversa. A energia liberada nesta reação é utilizada para o transporte de íons ou pequenas moléculas através da membrana plasmática. As principais classes de ATPases são as ATPases do tipo F, V e P que podem diferir na função, na estrutura e no tipo de íon transportado (NELSON; COX, 2014).

As ATPases do tipo F, também chamadas de ATP sintases são encontradas em mitocôndrias, cloroplastos e na membrana plasmática de algumas bactérias. Essas proteínas são formadas por duas subunidades principais denominadas de F_o e F_1 que são motores rotativos, acoplados e consecutivos. Desse modo, elas utilizam o gradiente eletroquímico gerado pelo transporte de íons (H^+ ou Na^+) através da membrana plasmática, causando uma rotação da subunidade F_o o que induz a catálise do ADP e P_i com a formação do ATP (DIEZ *et al.*, 2004). Contudo, em determinadas situações, pode ocorrer à hidrólise do ATP para manutenção do gradiente eletroquímico.

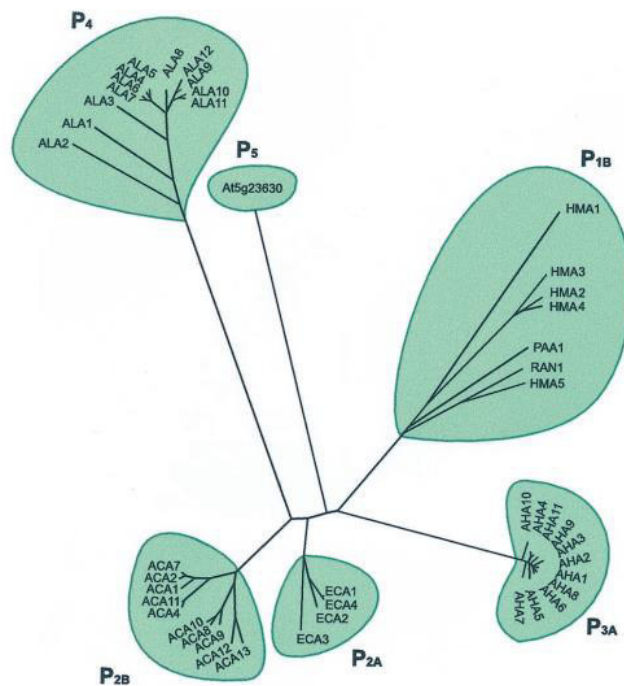
As ATPases do tipo V, por sua vez, são bombas de prótons encontradas em diferentes células eucarióticas e são responsáveis pela acidificação de muitos compartimentos celulares. Essas bombas formam um gradiente eletroquímico que atua no transporte de moléculas através da membrana do endossomo, Golgi, vesículas secretórias, vacúolos, lisossomos e outros componentes do sistema de endomembranas. Essas proteínas são formadas por dois domínios principais chamados de V_o e V_1 . O domínio V_o é formado por seis subunidades diferentes que atuam na translocação de prótons, enquanto V_1 apresenta oito diferentes subunidades que são responsáveis pela hidrólise do ATP (BOWMAN; BOWMAN, 2005).

Semelhante as duas classes anteriores, tem-se as ATPases do tipo P, proteínas que também utilizam a energia potencial da hidrólise do ATP para realizar o transporte ativo de pequenos íons. Entretanto, essas ATPases são caracterizadas por formarem um intermediário fosforilado durante seu ciclo catalítico, sendo esta reação uma etapa essencial para a transdução de energia e o deslocamento de íons antes da clivagem hidrolítica do P_i (INESI; PILANKATTA; TADINI-BUONINSEGNI, 2014). Quanto à estrutura, essas proteínas apresentam de oito a 12 segmentos transmembranares com as regiões amino e carboxiterminal

expostas para o citoplasma. Outra característica peculiar dessa classe de proteínas é a inibição protéica destas quando submetidas ao vanadato, um composto análogo ao fosfato (AXELSEN; PALMGREEN, 2001).

Ainda, as ATPases do tipo P foram classificadas de acordo com o tipo de íon transportado, bem como o agrupamento feito através de análise filogenética. Desse modo, essas proteínas foram evolutivamente divididas em cinco grandes subfamílias [P_{1B} , P_2 (P_{2A} e P_{2B}), P_{3A} , P_4 e P_5] (Figura 1), sendo agrupadas de acordo com o íon transportado (AXELSEN; PALMGREEN, 2001; PALMGREEN; NISSEN, 2011)

Figura 1 - Árvore filogenética das ATPases do tipo P onde é mostrada a formação de cinco ramos principais nomeados de P_{1B} , P_2 (P_{2A} e P_{2B}), P_{3A} , P_4 e P_5 .



Fonte: (AXELSEN; PALMGREEN, 2001)

As ATPases P_{1B} são as bombas de prótons envolvidas no transporte de metais pesados estando presente em várias formas de vida, sendo a ATPase mais comum em eubactérias e arqueas. Os principais íons envolvidos nesse transporte são Cu^+ , Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} e Cd^{2+} . Dentre as funções dessas proteínas, tem-se o suprimento de metais pesados necessários para a maturação das metaloproteínas e a extrusão de metais pesados tóxicos através da membrana plasmática. As ATPases do tipo P_{2A} (Ca^{2+} -ATPase) são

encontradas em diferentes seres vivos tais como bactérias, fungos e animais. Essas proteínas estão relacionadas aos processos de exportação do cálcio contra um gradiente de concentração, onde dois cálcios são exportados por um ATP hidrolisado e um contra-transporte de H^+ . Semelhante as proteínas P_{2A} , as ATPases do tipo P_{2B} também atuam no processo de exportação de cálcio diferindo no fato de que essas bombas de prótons são ativadas pela ligação do Ca^{2+} com a calmodulina. Já as proteínas da subfamília P_{3A} , denominadas de H^+ -ATPases, atuam no bombeamento dos íons H^+ para o ambiente extracelular, sendo encontradas em plantas e fungos. As ATPases da subfamília P_4 estão relacionadas com o transporte de componentes anfipáticos através da membrana plasmática, além de promover uma assimetria fosfolipídica atuando na inversão do fosfolipídio através da bicamada da membrana. As bombas de prótons da subfamília P_5 são presentes em eucariotos e apresentam um motivo conservado (PPxxP) presente no segmento transmembranar do domínio P. Entretanto, não está claramente definido qual a função das proteínas pertencentes a esta subfamília, bem como o seu tipo de substrato específico (AXELSEN; PALMGREEN, 2001; PALMGREEN; NISSEN, 2011).

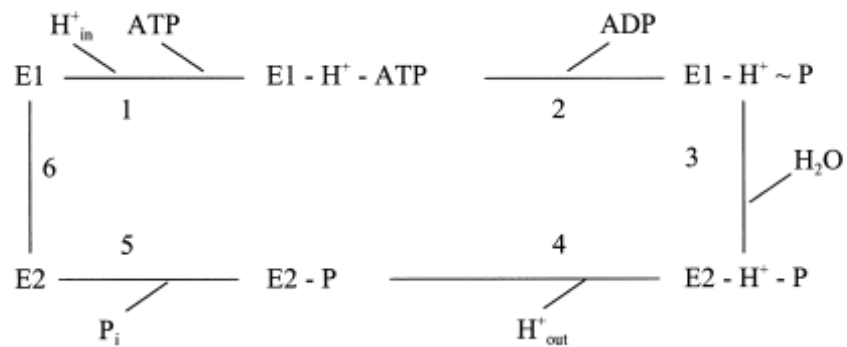
1.1 H^+ -ATPase de membrana plasmática

As H^+ -ATPases de membrana plasmática (MP) são classificadas como ATPases do tipo P, sendo agrupada na subfamília P_{3A} . Essas proteínas atuam no bombeamento de prótons do citoplasma para o ambiente extracelular, utilizando a energia química da hidrólise do ATP. Essa reação energiza a membrana plasmática gerando um potencial eletroquímico, que em plantas pode exceder -200 mV. Essa energia é utilizada como força próton motriz fundamental para a atividade de um grande grupo de transportadores secundários que movem íons e metabólitos contra um gradiente de concentração (PALMGREN, 2001; WADOWIKOWSKA;KLOBUS, 2016).

Outra importante característica observada nessas proteínas é a presença de um resíduo de aspartato fosforilado durante seu ciclo catalítico, o qual, é circundado pela sequência conservada dos aminoácidos DKTGTLT que identifica as H^+ -ATPases MP como pertencentes as ATPases do tipo P (AXELSEN; PALMGREEN, 2001). Essas bombas de prótons apresentam durante seu ciclo catalítico a presença de dois estados conformacionais distintos denominados E_1 e E_2 . O estado E_1 é caracterizado por ter uma alta afinidade tanto pelo ATP como pelo próton que será transportado para o ambiente extracelular, na

conformação E₂, essas bombas apresentam baixa afinidade para ambos os ligantes, mas apresentam uma alta afinidade por fosfato inorgânico, bem como pelo inibidor vanadato. Desse modo, o próton proveniente do ambiente citoplasmático se liga ao estado E₁, que após a hidrólise do ATP e a fosforilação do resíduo de aspartato, formará o complexo E₁P. Posteriormente, esse complexo será convertido em E₂P, havendo a liberação do próton para o ambiente extracelular. Esse mecanismo denominado de ciclo Post-Albers foi inicialmente proposto para as Ca²⁺-ATPases (Figura 2) e, posteriormente, estendido para as demais H⁺ -ATPases (MORSOMME; BOUTRY, 2000; KÜHLBRANDT, 2004).

Figura 2 - Ciclo de reação da H⁺ -ATPase de membrana plasmática, o qual foi originalmente proposto para as Ca²⁺ -ATPases.



Fonte: (MORSOMME; BOUTRY, 2000)

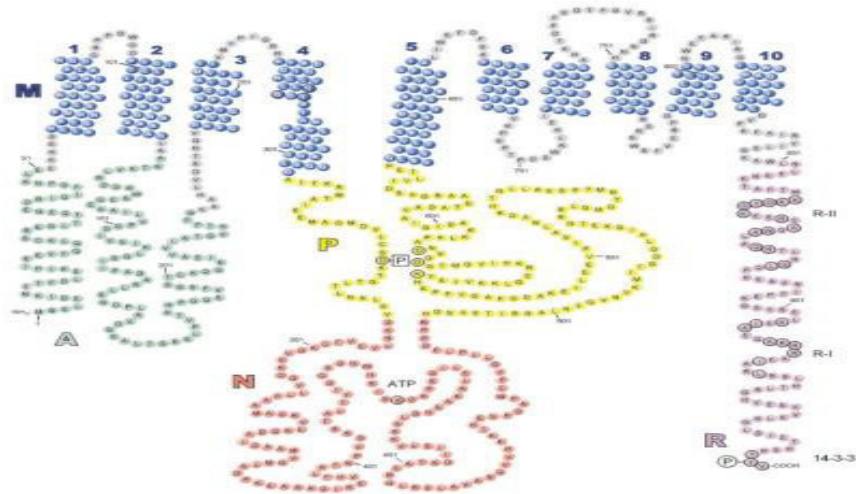
As H⁺ -ATPases MP são monômeros que apresentam uma massa molecular em torno de 100 kDa que podem se oligomerizar formando complexos diméricos ou hexaméricos (DUBY; BOUTRY, 2009). A análise de sua estrutura primária mostra a presença de 10 segmentos transmembranares (M1–M10) e quatro domínios citoplasmáticos (A, P, N e R) (Figura 2), como observado nos estudos com a eudicotiledônea *Arabidopsis thaliana* (PALMGREEN, 2001; PEDERSEN *et al.*, 2007). O domínio A, também chamado de atuador, corresponde à região aminoterminal; o domínio P, que corresponde ao domínio de fosforilação, apresenta um resíduo de aspartato fosforilado e a presença da sequência DKTGTLT. Subsequente a este, encontra-se o domínio N, que corresponde ao domínio de ligação do nucleotídeo onde está localizado o sítio de ligação do ATP. Já na região carboxiterminal, está presente o domínio R, onde ocorre o processo de regulação pós-traducional com a presença do sítio de ligação da proteína 14-3-3 que tem a capacidade de se

ligar aos aminoácidos serina (Ser) ou treonina (Thr) quando estão fosforilados. A ligação desta proteína ao domínio R resulta na ativação das H⁺ - ATPases. O processo de inativação desta proteína ocorre pela ação da enzima fosfatase que atua no processo de desfosforilação dos resíduos de Ser ou Thr, causando a liberação da proteína 14-3-3.

Este mecanismo regulatório está presente na maioria das H⁺ - ATPases. Todavia, em alguns sistemas biológicos, o processo de fosforilação é responsável pela inativação da bomba de próton (PALMGREN, 2001; KÜHLBRANDT, 2004; JUSTESEN *et al.*, 2013; HARUTA; GRAY; SUSSMAN, 2015). Além do mecanismo regulatório citado anteriormente, as bombas de prótons são estimuladas pelo íon potássio (K⁺) que se liga ao aspartato (Asp⁶¹⁷) presente no domínio P. Essa ligação promove a desfosforilação do ciclo de reação E₁P fosforilado, controlando a relação de acoplamento H⁺ / ATP. Tem sido sugerido que o K⁺ atua como um agente intrínseco desacoplador da H⁺ -ATPase MP (JANICKA-RUSSAK; KABAŁA, 2015).

As H⁺ -ATPase MP são codificadas por família multigênica apresentando em torno de 11 genes como tem sido mostrado em *Arabidopsis thaliana* (ARANGO *et al.*, 2003). Essas bombas de prótons também apresentam mecanismos de regulação transcricional. Estudos realizados em *Nicotiana plumbaginifolia* demonstraram que esses genes são expressos de forma diferenciada a depender do tecido, órgão e estágio de desenvolvimento (PEREZ *et al.*, 1992; OUFATTOLE; ARANGO; BOUTRY, 2000). Tem-se descrito na literatura que essas proteínas também apresentam um perfil diferencial de expressão dos genes quando submetidas a condições de estresse, como observado nas espécies *Sorghum bicolor*, *Cucumis sativus* e *Aeluropus litoralis* que apresentaram um aumento no perfil de expressão gênica quando submetidas a condições de estresse salino e hídrico (OLFATMIRI *et al.*, 2014; WDOWIKOWSKA; KLOBUS, 2016; MIRANDA *et al.*, 2017). Embora os transportadores H⁺ -ATPase MP apresentem um papel central em diferentes processos fisiológicos, a quantidade de estudos sobre o perfil de expressão e a função de cada membro gênico ainda é escassa, sendo restrita a poucas espécies.

Figura 3 - Estrutura primária da H⁺ -ATPase MP em *Arabidopsis thaliana* mostrando a presença de um domínio de membrana (M) com seus dez segmentos transmembranares e os quatro domínios citoplasmáticos (A, P, N e R)



Fonte: (PALMGREEN, 2001).

1.2 Papel fisiológico das H⁺ - ATPases de membrana plasmática em plantas

Em plantas, as H⁺ -ATPases MP são responsáveis pelo estabelecimento de um gradiente eletroquímico causado pela energização da membrana plasmática. A energia proveniente dessa diferença de potencial é utilizada para a realização de transportes de soluto, carregamento e descarregamento do xilema e do floema, bem como para a absorção de nutrientes pelas raízes (DUBY; BOUTRY, 2009). Além disso, tem-se relacionado à presença dessas bombas de prótons com diferentes processos fisiológicos, tais como, abertura estomática, alongação e crescimento celular, regulação do pH intracelular e manutenção da homeostase iônica (MORSOMME; BOUTRY, 2000; PALMGREN, 2001; TODA *et al.*, 2016).

O xilema e o floema são tecidos responsáveis pelo transporte de seiva bruta (água e sais minerais) e elaborada (açúcar e outros compostos orgânicos), respectivamente, para todas as partes da planta com os processos de carregamento e descarregamento dependentes da ativação das bombas de prótons. A análise do padrão de expressão dos genes da H⁺ -ATPase MP em *Nicotiana plumbaginifolia* demonstrou que esses genes são altamente expressos em células do floema (PALMGREN, 2001; DUBY; BOUTRY, 2009). Nos

processos em que ocorre a diminuição da expressão desses genes também é observada uma redução nos processos de transporte de compostos orgânicos, provenientes da fotossíntese, para as demais partes da planta (ZHAO *et al.*, 2000). De modo análogo, a análise do perfil de expressão dos genes da H^+ -ATPase de membrana plasmática em *Arabidopsis thaliana* também revelou que o gene AHA4 foi fortemente expresso em células endodérmicas da raiz, sugerindo uma relação entre o processo de ativação das bombas de prótons e a absorção de nutrientes pela raiz (PALMGREN, 2001).

O papel das H^+ -ATPase MP na abertura e fechamento das células estomáticas tem sido demonstrado através de estudos em *Oryza sativa*, onde foi possível observar que o número de estômatos abertos durante a exposição a radiação luminosa foi proporcional a ativação da bomba de prótons (TODA *et al.*, 2016). Efeito semelhante também pode ser observado em células-guarda expostas à luz azul, onde a ativação da bomba de prótons estimulou a abertura dos canais de K^+ , possibilitando um maior influxo desse cátion juntamente com as moléculas de água. Esse processo levou a turgidez das células-guarda e a consequente abertura estomática (YAMAUCHI *et al.*, 2016).

O fenômeno de alongação celular também está associado ao processo de ativação das bombas de prótons e a consequente acidificação do apoplasto, induzindo o afrouxamento da parede celular e a hiperpolarização da membrana plasmática o que favorece a absorção de K^+ . Esse processo promove mudanças osmóticas seguidas pelo influxo de água, via aquaporinas, pela membrana plasmática, permitindo, deste modo, a alongação celular. Outra função fisiológica atribuída as essas bombas é a regulação do pH intracelular por meio de um mecanismo que ainda não está bem elucidado. Sabe-se, porém, que o pH interno da célula é em torno de 7,5, enquanto que o pH necessário para a ativação das bombas de prótons é ligeiramente abaixo de 7,0. Desse modo, quando ocorre a acidificação do citosol, as H^+ -ATPase MP são ativadas, causando a extrusão de prótons para o ambiente extracelular e consequente alcalinização do citosol (MORSOMME; BOUTRY, 2000).

1.3 O papel das H^+ -ATPase MP em plantas submetidas a estresses ambientais

As plantas estão continuamente expostas a diferentes tipos de estresse, tanto bióticos como abióticos, que alteram o seu metabolismo podendo prejudicar o seu

desenvolvimento e crescimento. O impacto causado pelo estresse sobre o metabolismo vegetal vai depender da intensidade, do tempo de exposição, bem como dos genótipos estudados (TAIZ; ZEIGER, 2017).

As plantas, entretanto, apresentam diversos mecanismos de tolerância às condições adversas do ambiente. Entre eles, a capacidade que a célula tem de reprogramar o perfil de expressão de genes específicos (HAAK *et al.*, 2017). Desse modo, os genes, que apresentam uma alteração no perfil de expressão durante o tempo exposição ao estresse, são, provavelmente, importantes para estudos sobre melhoramento genético de plantas. Entre esses genes, estão os que codificam bombas de prótons H^+ -ATPase MP e desempenham um papel central na aclimação ao estresse (JANICKA-RUSSAK; KABALA, 2015). Assim, para que as plantas consigam sobreviver, crescer e reproduzir, quando expostas as condições adversas do ambiente, é necessário uma eficiente regulação da atividade e expressão das bombas de prótons (GAXIOLA *et al.*, 2007).

Entre os principais estresses que afetam o desenvolvimento vegetal estão os de origem biótica causados pelas infecções por patógenos e de origem abiótica ocasionados por fatores ambientais, tais como temperatura, disponibilidade de água no solo e a toxicidade causada tanto pela salinidade como pela exposição a metais pesados (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015; JANICKA-RUSSAK; KABALA, 2015).

Em habitats naturais, as plantas estão expostas a uma diversidade de microorganismos patogênicos tais como vírus, bactérias, fungos e nematódeos que podem causar infecção que comprometem o desenvolvimento do vegetal, podendo, levá-lo a morte. As principais formas de entrada dos patógenos nas plantas são através de injúrias causadas na cutícula e parede celular, e pela abertura dos estômatos, hidatódios e lenticelas (TAIZ; ZEIGER, 2017). Entretanto, as plantas desenvolveram diferentes mecanismos de resistência a infecção por patógenos, tais como a presença de barreiras físicas e químicas e a indução do sistema de defesa desencadeado pelos PAMPs (do inglês, *Pathogen Associated Molecular Patterns*) que limitam a proliferação dos patógenos. Entre os mecanismos de defesa induzidos, tem-se a diminuição da atividade da H^+ -ATPase MP e, conseqüentemente, o fechamento estomático (KAUNDAL *et al.*, 2017), limitando a entrada de patógenos e a perda excessiva de água pela planta, condição que causaria a murcha e provável morte do vegetal.

Quanto ao estresse por variação da temperatura, este afeta o metabolismo vegetal, alterando diferentes processos fisiológicos, tais como a respiração e a fotossíntese, podendo comprometer o crescimento e, em determinadas situações, levar a morte da planta. Os estresses térmicos são causados pela elevação ou redução da temperatura. O estresse causado

pelo calor, que comumente ocorre em regiões tropicais, leva a uma redução dos processos respiratórios e fotossintéticos, gerando um aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) (TAIZ; ZEIGER, 2017) e fluidez da membrana plasmática, alterando a homeostase e a regulação iônica (LIU *et al.*, 2009). Já o estresse causado pelo frio ocorre frequentemente em regiões de clima temperado. Quando as plantas são expostas a baixas temperaturas, elas podem apresentar diferentes alterações fisiológicas, tais como a ruptura de micro-organelas, modificação nas estruturas dos lipídeos de membrana, desbalanceamento osmótico, diminuição do turgor celular, bem como uma redução do crescimento (THAKUR *et al.*, 2010; LOS *et al.*, 2013).

A manutenção e o restabelecimento do gradiente iônico, através das bombas de prótons, têm sido sugeridos como mecanismo para reduzir os efeitos deletérios dos estresses térmicos, tanto pelo calor como pelo frio. Estudos conduzidos em *Pisum sativum* demonstraram uma diminuição da atividade das bombas de prótons quando submetidas ao estresse por calor (ZHANG *et al.*, 2006), enquanto experimentos com *Camelina sativa* e *Brassica napus* submetidos a baixas temperaturas indicaram um aumento na atividade das H⁺-ATPases MP (KIM *et al.*, 2013). Relatos na literatura também sugerem que a ativação das bombas de prótons está associada a alterações nos lipídeos de membrana em plantas submetidas a baixas temperaturas (JANICKA-RUSSAK; KABALA, 2015).

O estresse hídrico pode ser causado pelo excesso ou pela escassez de água. As plantas que crescem em ambientes alagados estão sujeitas a condições de hipóxia ou anóxia. Essa condição reduz a taxa respiratória das raízes e a consequente absorção de oxigênio, causando uma redução energética, além de alterar a homeostase iônica celular podendo levar a acidificação do citosol (SHABALA *et al.*, 2015). Nessas condições, na qual o citosol é acidificado, as H⁺-ATPases MP são ativadas, evitando ou reduzindo a acidificação desse compartimento celular através da extrusão de prótons para o ambiente extracelular (MORSOMME; BOUTRY, 2000).

A deficiência hídrica, por sua vez, configura-se como uma indisponibilidade de água para as plantas, resultante da diminuição do potencial osmótico do solo ocasionada pela escassez de água. Entre as principais causas de deficiência hídrica, tem-se a ocorrência das secas em ambientes com baixa precipitação pluviométrica (TAIZ; ZEIGER, 2017). Nesses ambientes onde a quantidade de água disponível para os processos de absorção e transporte é limitada, as plantas apresentam uma redução do potencial hídrico foliar e da abertura estomática alterando a atividade fotossintética, além de limitar os processos de alongação e divisão celular que são fundamentais para o desenvolvimento e crescimento vegetal (ZHAO

et al., 2000; OSAKABE *et al.*, 2014).

O estresse salino é causado pelo acúmulo de sais no solo, e ocorre principalmente em regiões áridas e semiáridas. Em ambientes com elevada concentração de NaCl, o íon Na⁺ entra nas raízes da planta de forma passiva através dos canais de cátions não seletivos. O aumento desses íons na célula causa alterações de natureza iônica e osmótica afetando importantes processos fisiológicos. Entre os efeitos do estresse salino tem-se a redução da absorção de água pelas raízes, resultante do componente osmótico, bem como a absorção e acúmulo de íons tóxicos, especialmente o cloreto (Cl⁻) e o sódio (Na⁺) (MUNNS, 2002; FLOWERS, 2004). A salinidade também altera a absorção de nutrientes e a permeabilidade da membrana, causando mudanças no metabolismo celular, no balanço hormonal, nas trocas gasosas, bem como na homeostase redox, devido à produção e acúmulo de EROs que podem levar a oxidação de componentes celulares (PRISCO; GOMES-FILHO; MIRANDA, 2017).

As plantas apresentam mecanismos que possibilitam sua aclimação a esses ambientes salinos, entre eles tem-se o ajustamento osmótico e o controle da homeostase iônica intracelular. Além disso, essas bombas geram um gradiente eletroquímico responsável pela ativação do antiporte SOS₁ (do inglês, *Salt Overly Sensitive 1*) que atua no controle do transporte de Na⁺ a longa distância e promove a extrusão do Na⁺ do citoplasma para o ambiente extracelular, permitindo a sobrevivência e desenvolvimento das plantas em condições salinas (JANICKA-RUSSAK; KABALA, 2015).

As plantas quando submetidas a estresse por metais pesados podem apresentar danos na membrana plasmática ocasionando um aumento de sua permeabilidade. Esse efeito se dá pela facilidade que os íons metálicos têm de se ligar aos grupamentos sulfidrilas das proteínas e hidroxilas dos fosfolípidos, além de poderem substituir o íon cálcio em sítios essenciais da membrana plasmática (JANICKA-RUSSAK; KABALA, 2015). Essas modificações podem alterar a homeostase iônica prejudicando o desenvolvimento do vegetal.

O estabelecimento e a manutenção do balanço iônico são fundamentais para reduzir os danos causados por esse tipo de estresse. Raízes de *Cucumis sativus* submetidas a estresse por cádmio apresentaram aumento na ativação dessas bombas de prótons, bem como um aumento no perfil de expressão dos genes que codificam a H⁺-ATPases MP, sugerindo que essas proteínas estão associadas a manutenção da homeostase iônica em situações de estresse (JANICKA-RUSSAK; KABALA; BURZYNSKI, 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar a estrutura e distribuição filogenética da família multigênica H⁺ -ATPase de membrana plasmática em monocotiledôneas e avaliar *in silico* o perfil de expressão desses genes em *Zea mays* submetidos a diferentes estresses e durante o desenvolvimento.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar e anotar os membros gênicos da família H⁺ -ATPase de membrana plasmática em genomas disponíveis das espécies de monocotiledôneas;
- Caracterizar estruturalmente os membros gênicos da família multigênica H⁺ -ATPase de membrana plasmática, bem como as proteínas codificadas por eles, em monocotiledôneas;
- Analisar a distribuição filogenética da família multigênica H⁺ -ATPase de membrana plasmática em monocotiledôneas.
- Avaliar o perfil de expressão *in silico* dos genes da família multigênica H⁺ -ATPase de membrana plasmática em *Zea mays* em diferentes tipos de tecido durante o desenvolvimento e submetidas a diferentes condições de estresse.
- Analisar a região promotora dos genes da H⁺ -ATPase de membrana plasmática em *Zea mays*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Identificação e caracterização dos genes da família multigênica H⁺ -ATPase de membrana plasmática em monocotiledôneas.

A identificação dos genes da família multigênica H⁺ -ATPase de membrana plasmática foi realizada através da ferramenta BLAST ([Basic Local Alignment Search Tool](#)) disponível no GenBank do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (ALTSCHUL *et al.*, 1997). A sequência protéica da H⁺ -ATPase de membrana plasmática do arroz (ID: [XP_015620234.1](#)) foi utilizada como referencia para a busca por genes homólogos nos bancos de dados do *Whole Genome Shotgun* (WGS), *Refseq representative genomes* do GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e *Phytozome* (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). As buscas foram feitas nos genomas das espécies *Musa acuminata* (*MaPHA*); *Aegilops tauschii* (*AgtPHA*); *Brachypodium distachyon* (*BdPHA*); *Oryza sativa* (*OsPHA*); *Panicum hallii* (*PhPHA*); *Leersia perrieri* (*LpPHA*); *Sorghum bicolor* (*SbPHA*); *Setaria viridis* (*SvPHA*); *Zea mays* (*ZmPHA*); *Zoysia japônica* (*ZjPHA*); *Ananas comosus* (*AcPHA*); *Elaeis guineenses* (*EgPHA*); *Phoenix dactylifera* (*PdPHA*); *Phalaenopsis sequestris* (*PePHA*); *Dendrobium catenatum* (*DcPHA*) e *Zostera marina* (*ZosmaPHA*) pertencentes ao grupo das monocotiledôneas juntamente com a alga *Chlamydomonas reinhardtii* (*CrPHA*) (grupo externo), a angiosperma basal *Amborella trichopoda* (*AmtPHA*); e a eudicotiledônea *Arabidopsis thaliana* (*AHA*). Entretanto, das sequências homólogas encontradas, apenas aquelas que tiveram identidade acima de 45% foram selecionadas. Posteriormente, estes genes foram manualmente anotados para a dedução dos cDNAs, utilizando como referência as sequências de H⁺ -ATPase de membrana plasmática depositadas nos bancos de dados transcriptômicos, tais como *Refseq_RNA* (*Reference RNA sequence*), *EST* (*Expressed Sequence Tags*) e *TSA* (*Transcriptome Shotgun Assembly*). Em seguida, os cDNAs deduzidos foram traduzidos em sequências de aminoácidos com o auxílio da ferramenta de tradução disponível no servidor web *EXPASY* (web.expasy.org/translate). Já as proteínas deduzidas foram validadas através da comparação com sequências homólogas, depositadas no banco de proteínas *nr* (*Non-redundant*). O processo de anotação foi realizado de acordo com o método proposto por Costa *et al.* (2014).

O processo de identificação e anotação dos genes codificantes para as bombas de prótons H⁺ -ATPase MP permitiram a caracterização gênica onde foi possível avaliar o número de éxons/íntrons, a janela de leitura aberta (ORFs) e a quantidade de aminoácidos

presentes em suas proteínas.

3.2 Configuração dos éxons/introns dos genes da família H⁺ -ATPase de membrana plasmática em monocotiledôneas.

A estrutura gênica mostrando a disposição dos éxons, íntrons de cada gene deduzido para as H⁺ -ATPase MP foi obtida através da ferramenta *Web Gene Structure Display Server* (GSDS) (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn>), onde foram alinhadas as seqüências do cDNA com suas seqüências genômicas correspondentes. Em seguida, a espécie *Arabidopsis thaliana* foi utilizada como referencia para a identificação de inserções ou deleções de íntrons entre os genes ortólogos.

3.3 Alinhamento de seqüências e análise filogenética

O alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidos anteriormente foi realizado através do algoritmo MUSCLE, usando o UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*) como método de agrupamento. A análise filogenética foi construída através do método *Neighbor joining* (SAITOU; NEI, 1987) utilizando como modelo de substituição o *Poisson model*. Foram usados valores de *bootstraps* gerados a partir de 1000 replicatas através do programa MEGA 7.0. (KUMAR *et al.*, 2016).

3.4 Análise *in silico* da expressão gênica da H⁺ -ATPase de membrana plasmática via RNAseq

A análise de expressão foi restrita a plantas de milho (*Zea mays* L), uma espécie amplamente cultivada no Brasil, sendo um dos principais cereais utilizados na alimentação humana e animal. Essa espécie também apresenta uma quantidade significativa de dados transcriptômicos depositados no banco do *Sequence Read Archive* (SRA) do NCBI, com um total de 3.444 bioprojetos até a presente data (abril, 2019), permitindo assim a escolha de bioprojetos com *reads* de melhor qualidade ($Q > 20$). Além disso, a análise filogenética revelou a presença de pelo menos uma sequência protéica representativa de *Zea mays* nos clados formados, com a exceção do clado III. Desse modo, a análise da expressão diferencial dos genes da família H⁺ -ATPase de membrana plasmática em plantas de milho foi realizada com base nos dados de RNA-seq, disponíveis no banco do *Sequence Read Archive* (SRA) do NCBI. Foram selecionados bioprojetos de sequenciamento de transcriptomas da espécie *Zea mays*, submetida a diferentes tipos de estresses e em diferentes tecidos durante o

desenvolvimento vegetal (Tabela 1). As bibliotecas de cDNA foram baixadas no formato “fastq”.

Em seguida, as bibliotecas de cDNA foram analisadas quanto a qualidade dos reads. Para remover as sequências dos adaptadores utilizados na construção da biblioteca de cDNA, dos reads de qualidade inferior ($Q < 20$) e de tamanho muito reduzido (< 50 pb) foi utilizada a ferramenta Trimmomaticv.0.36 (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>) (BOLGER *et al.*, 2014). Em seguida, a qualidade dos reads selecionados após a filtragem foi verificada através do programa FastQCv.0.11.7 (ANDREWS, 2010). Posteriormente, os reads com a qualidade requerida foram utilizados para mapeamento dos genes de H⁺ -ATPase MP utilizando os parâmetros padrões das ferramentas TopHat v.2.1.1 (KIM *et al.*, 2013) e Bowtie v. 2.2.9 (LANGMEAD; SALZBERG, 2012).

Já a contagem bruta do número de *reads*, que mapearam contra os genes de H⁺ -ATPase MP, foi estimada através da ferramenta HTSeq v. 0.9.1 (https://htseq.readthedocs.io/en/release_0.9.1/) (ANDERS *et al.*, 2015), com base na 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 *cpm function* do pacote *edgeR* (ROBINSON *et al.*, 2010). Apenas os genes com $CPM \geq 2$ em pelo menos três das bibliotecas de cada bioprojeto foram selecionados para análise de expressão.

Para verificar o comportamento das replicatas, foi conduzida uma análise de componentes principais (ACP) baseado no arquivo de contagem após normalização e filtragem. A ACP e os genes diferencialmente expressos (GDEs) foram determinados através do programa R v. 3.4.1 (RCORE TEAM), utilizando o pacote DESeq2 v. 1.30.0 (<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html>) (LOVE *et al.*, 2014). Foram considerados como diferencialmente expressos apenas os genes que apresentaram valor de \log_2 fold-change ≤ -1 ou ≥ 1 e o valor de p ajustado $< 0,05$.

Tabela 1- Experimentos de RNA seq utilizados para obter o perfil de expressão dos genes da H⁺-ATPase em *Zea mays*.

Acesso do bioprojeto	Cultivar	Tecido	Tratamento	Detalhamento experimental	Replicatas	Referência
PRJNA 267717	M162w, B73	Folhas	Controle e submersão em água	As folhas das linhagens B73 e M162w foram analisadas em três condições: controle 24h (não submerso), 24h de submersão e 72h de submersão.	Três	Genetic and Molecular Characterization of Submergence Response Identifies <i>Subtol6</i> as a Major Submergence Tolerance Locus in Maize (CAMPBELL <i>et al.</i> , 2015).
PRJNA290444	B73	Raízes embrionárias e pós-embrionárias	Controle e altas concentrações de nitrogênio no solo	Raízes embrionárias e pós-embrionárias de 49 dias submetidas a altas concentrações de Nitrogênio (LoHN, alto fornecimento local de nitrato: HN 4	Três	Phenotypic plasticity of the maize root system in response to heterogeneous nitrogen availability (YU <i>et al.</i> , 2014)

				mM, e condição controle de 0,5 mM).		
PRJNA 271928	B73	Córtex, estilo-estigma e zonas meristemáticas e de alongação da raiz primária	Controle e deficiência hídrica	Estresse hídrico imposto por submissão a um potencial hídrico de -0.8 MPa e condição controle.	Quatro	Extensive tissue-specific transcriptomic plasticity in maize primary roots upon water deficit (OPITZ <i>et al.</i> , 2016).
PRJNA 436207	Yayu889	Folhas	Controle e infecção por fungo.	Folhas de milho infectadas com a doença da mancha cinza com oito, dez e 12 dias de infecção.	Três	Transcriptome analysis reveals the molecular mechanisms of the defense response to gray leaf spot disease in maize (YU <i>et al.</i> , 2018)
PRJNA 80075	B73	Pólen, óvulo, saco embrionário e plântula	-	-	Três	Não encontrado.

PRJNA 217053	B73	Internódio, estilo- estigma, pólen maduro, córtex da raiz, ponta do primórdio da espiga, folha madura e grãos germinados .	-	-	Três	Integration of omic networks in a developmental atlas of maize (WALLEY <i>et al.</i> , 2016)
---------------------	-----	--	---	---	------	--

Fonte: elaborado pela autora.

3.5 Análise da região promotora

A análise dos possíveis elementos *cis* regulatórios encontrados na região promotora, 1000 pares de base que antecedem o sítio de início de tradução da H⁺-ATPase MP, foi realizada através dos servidores PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) (LESCOT *et al.* 2002) e New Place (<https://sogo.dna.affrc.go.jp>) (HIGO *et al.* 1999).

3.6 Análise estatística

As contagens normalizadas (CPM) obtidas através dos dados de RNA seq coletados a partir de experimentos com *Zea mays* foram analisadas estatisticamente pelo *software* GraphPad Prism 5.0, através da análise de variância (ANOVA), por meio do teste de *one-way*, seguido pelo teste de Bonferroni. Foram consideradas significantes diferenças com $p < 0,05$. Os resultados foram expressos com uma média de +/- desvio padrão de três replicatas biológicas.

4 RESULTADOS

4.1 Identificação, anotação e caracterização dos genes da H⁺ -ATPase de membrana plasmática em monocotiledôneas.

No presente estudo foram identificadas e anotadas um total de 180 sequências gênicas que codificam as bombas de prótons H⁺ -ATPase de membrana plasmática, sendo um total de 161 sequências em monocotiledôneas, duas pertencentes a alga *Chlamydomonas reinhardtii*, seis da angiosperma basal *Amborella trichopoda* e onze da eudicotiledônea *Arabidopsis thaliana*. As sequências proteicas deduzidas, aqui analisadas, apresentaram entre si uma variação de 79 a 94% de identidade.

Dentre os genes identificados em monocotiledôneas, revelou-se a presença de sete genes na ordem Alismatales, cinco em Asparagales, nove a 12 em Poales, 11 a 12 em Arecales e 18 em Zingiberales (Tabela 2). A espécie *Arabidopsis thaliana* utilizada como planta modelo em estudos com a bomba de prótons H⁺ -ATPase MP foi usada como referência. Desse modo, as ordens basais Alismatales e Asparagales apresentaram um número de genes superior à alga *Chlamydomonas reinhardtii*, mas similar a *Amborella trichopoda* e inferior ao encontrado na espécie de referência. As ordens Poales e Arecales tiveram um número de genes superior a alga e a angiosperma basal, mas semelhante ao encontrado na eudicotiledônea. O número de genes encontrados em Zingiberales foi superior ao identificado nas demais ordens, bem como na alga, angiosperma basal e na espécie de referência.

A caracterização estrutural dos genes, por sua vez, revelou que as sequências gênicas continham entre dois e 22 éxons e, conseqüentemente, de um a 21 íntrons. As espécies *Chlamydomonas reinhardtii*, *Amborella trichopoda* e *Arabidopsis thaliana* apresentaram uma variação de 10 a 11, de 16 a 20 e de 8 a 20 íntrons, respectivamente. Nas ordens Alismatales, Asparagales e Poales foram identificadas uma variação de quatro a 19, de três a 20 e de um a 20 íntrons, respectivamente, não sendo encontrado um padrão por espécies, como por exemplo, a espécie *Sorghum bicolor*, apresentou sequências que continham um íntron, enquanto outras apresentavam um total de 20. Já as ordens Arecales e Zingiberales apresentaram uma quantidade semelhante de íntrons, variando de 12 a 20 e de 10 a 21, respectivamente (Tabela 2).

A análise dos genes mostrou que o tamanho da janela de leitura aberta (ORF, *open reading frame*) variou de 2.571 a 3.597 pares bases (pb), tendo sido encontrada na alga, na

angiosperma basal e na espécie de referência uma variação de 3.246, 2.853 a 2.919, 2.801 a 3.194 pb, respectivamente. Dentre as monocotiledôneas analisadas, as sequências gênicas pertencentes à ordem Poales foram as que apresentaram a maior diferença no tamanho da ORF, com uma variação 2.571 a 3.597 pb (Tabela 2).

As proteínas codificadas pelas ORF citadas anteriormente apresentaram entre 857 e 976 aminoácidos. As espécies *Chlamydomonas reinhardtii*, *Amborella trichopoda* e *Arabidopsis thaliana* apresentaram um total de 1081, de 950 a 963 e de 948 a 960 aminoácidos, respectivamente. Nenhuma ordem analisada apresentou uma quantidade de aminoácidos superior à identificada em *Chlamydomonas reinhardtii*. Contudo, as espécies da ordem Poales foram as que mais diferiram entre si, sendo observada variação de 857 a 976 aminoácidos nas sequências protéicas analisadas (Tabela 2).

Tabela 2 - Caracterização dos genes da H⁺ -ATPase de membrana plasmática em monocotiledôneas.

Ordem	Família	Número de genes	Número de éxons	Número de íntrons	(ORF) (pb)	Quantidade de aminoácidos
Amborellales	Amborellaceae	6	17 a 21	16 a 20	2.853 a 2.919	950 a 963
Zingiberales	Musaceae	18	11 a 22	10 a 21	2.850 a 3.146	949 a 961
Poales	Poaceae	9 a 12	2 a 21	1 a 20	2.571 a 3.597	857 a 976
	Bromeliaceae	10	12 a 21	11 a 20	2.850 a 3.105	949 a 971
Arecales	Arecaceae	11 a 12	13 a 21	12 a 20	2.850 a 2.916	949 a 971
Asparagales	Orchidaceae	5	4 a 21	3 a 20	2.749 a 2.913	944 a 970
Alismatales	Zoosteraceae	7	5 a 20	4 a 19	2.643 a 2.883	880 a 960

Fonte: elaborado pelo autor

4.2. Análise das relações filogenéticas entre os genes da bomba da próton H⁺ -ATPase de membrana plasmática em monocotiledôneas.

A análise filogenética revelou que os genes da H⁺ -ATPase MP foram distribuídas em cinco clados distintos identificados como clado I-V. Nos clados III e V, as sequências gênicas foram nomeadas de H⁺ -ATPase3 e H⁺ -ATPase5 unicamente, tendo em vista a existência de apenas uma sequência representativa em cada espécie. Já nos clados I e II e IV, as sequências foram nomeadas de H⁺ -ATPase1 (1a, 1a1 ou 1a2, 1b ou 1b1 ou 1b2, 1c) e, H⁺ -ATPase2 (2a, ou 2a1 ou 2a2, ou 2b ou 2b1 ou 2b2, ou 2c ou 2c1 ou 2c2 ou 2d), H⁺ -ATPase4 (4a ou 4a1 ou 4a2, 4b, ou 4b1 ou 4b2, ou 4c, ou 4d1 ou 4d2, ou 4e) respectivamente, por apresentarem duas ou mais sequências representativas na mesma espécie (Figura 4).

Os clados I e II agruparam um total de 46 e 55 sequências protéicas respectivamente, apresentando pelo menos um representante de cada espécie. Já o clado III apresentou um total de 12 sequências protéicas, entretanto, não foram identificados representantes das espécies *Phalaenopsis equestris*, *Dendrobium catenatum* (ambas da ordem Asparagales), *Sorghum bicolor*, *Panicum hallii* e *Zea mays* (ambos da ordem Poales). O clado IV, por sua vez agrupou um total de 51 sequências protéicas, não sendo identificados representantes da espécie *Amborella tricopoda*. Já o clado V agrupou um total de 14 sequências protéicas, sendo ausentes os representantes das espécies *Musa acuminata* (ordem Zingiberales) e *Oryza sativa* (ordem Poales). A espécie *Zostera marina* (ordem Alismatales) não apresentou representantes nos clados III e V (Figura 4)

Figura 4 - Análise filogenética da H⁺ -ATPase MP de monocotiledôneas. As sequências gênicas das H⁺ -ATPase MP foram agrupadas em cinco clados distintos nomeados de I a V. As cores, verde, rosa, vermelho, laranja e roxo, e azul foram utilizadas no processo de identificação dos clados I, II, III, IV e V respectivamente. A cor marrom foi utilizada para identificar a alga *Chlamydomonas reinhardtii* utilizada como grupo externo.

4.3 Expressão *in silico* dos genes da H⁺ -ATPase de membrana plasmática em *Zea mays*.

A análise *in silico* da expressão dos genes H⁺ -ATPase MP em *Zea mays* revelou que a maioria dos membros gênicos foram expressos nos diferentes tecidos analisados durante o desenvolvimento e sobre as diferentes condições de tratamento. Contudo, foi demonstrado que o padrão de expressão dos genes foi variável em relação às condições analisadas (Figuras 4, 5 e 6).

4.3.1 Expressão *in silico* dos genes da H⁺ -ATPase de membrana plasmática submetidos a condições de estresse.

A investigação *in silico* do perfil de expressão dos genes da H⁺ -ATPase MP foi realizada em experimentos com plantas de milho (*Zea mays*) submetidas aos seguintes estresses ambientais: infecções por patógenos, estresses hídrico (por submersão e deficiência hídrica) e nutricional (Tabela 1). Embora os genes tenham sido expressos em todas as condições analisadas, nem todos foram diferencialmente expressos, ou seja, não tiveram um \log_2 fold-change ≤ -1 ou ≥ 1 e o valor de p ajustado $< 0,05$. Além disso, foi identificado que os genes pertencentes ao clado V, não foram diferencialmente expressos em nenhuma das condições analisadas.

O perfil de expressão dos genes da H⁺ -ATPase MP em folhas de milho infectadas pelos fungos *Cercospora zea-maydis* e *Cercospora zeina*, causadores da doença da mancha cinza, foi avaliado em três estágios (8, 10 e 12 dias após a infecção) e observou-se que somente os genes *ZmPH1b* e *ZmPHA2b1* foram diferencialmente expressos. Desses genes, apenas *ZmPHA2b1* foi regulado positivamente (\log_2 fold-change ≥ 1) no terceiro estágio (12 dias). Entretanto, o *ZmPHA1b* foi regulado negativamente nos três estágios do desenvolvimento (Figura 5-A).

O padrão de expressão diferencial dos genes H⁺ -ATPase MP, em folhas de plantas de milho submetidas a estresse por submersão, também foi analisado em cultivares com graus variados de tolerância (B73 e M162w, sensível e tolerante, respectivamente) a essa condição e em dois períodos (24 e 72 horas após a indução do estresse), apresentando expressão diferencial dos genes *ZmPHA1*, *ZmPHA1a*, *ZmPHA1b*, *ZmPHA4*, *ZmPHA4b2* e *ZmPHA2b1*. O gene *ZmPHA1* foi regulado negativamente no cultivar M162w em ambos os períodos analisados. Similarmente, os genes *ZmPHA1a* e *ZmPHA1b* também foram regulados

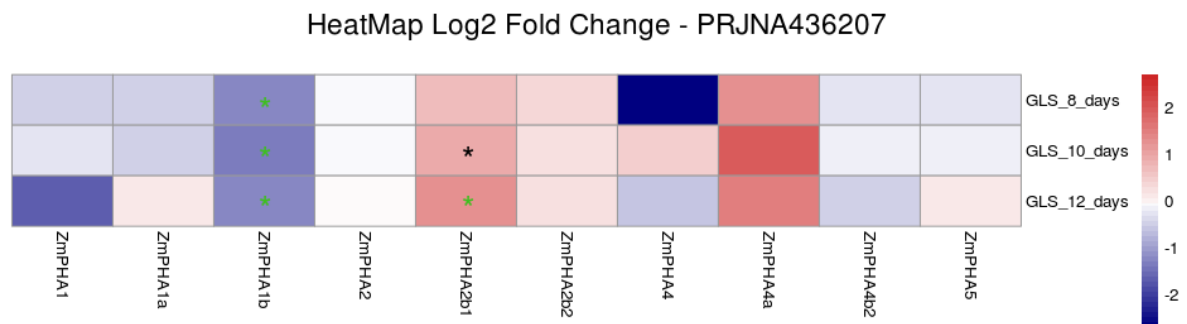
negativamente em ambos os períodos no cultivar B73. Também foi identificado que o gene *ZmPHA1b* foi regulado positivamente no cultivar M162w em ambos os períodos analisados. O gene *ZmPHA4* foi regulado positivamente no cultivar M162w no período de 24h. O gene *ZmPHA4b2*, por sua vez, também foi regulado positivamente no cultivar M162w após 24 horas de submissão ao estresse, no entanto, no cultivar B73 apresentou perfil de expressão negativo em ambos os períodos analisados. Já o gene *ZmPHA2b1* foi regulado positivamente e negativamente após 24 horas de indução do estresse no cultivar B73 e M162w, respectivamente (Figura 5-B).

A análise dos tecidos do córtex, do estilo-estigma e das zonas meristemáticas e de alongação da raiz primária do milho, submetidos a estresse por deficiência hídrica demonstraram que apenas os genes *ZmPHA4a* e *ZmPHA2* foram diferencialmente expressos. Esses genes foram regulados positivamente nas regiões do córtex e zona de alongação. Não foram identificados genes regulados negativamente, nem a presença de genes diferencialmente expressos nos tecidos do estilo-estigma e da zona meristemática (Figura 5-C).

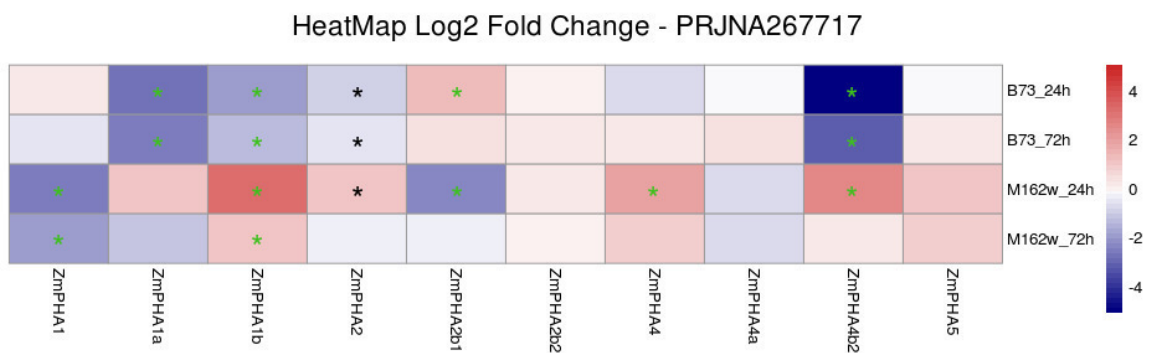
O estudo do desenvolvimento dos tecidos de raízes embrionárias (raízes primárias e seminais) e raízes pós embrionárias (coroa da raiz e raiz suporte) submetidas a altas concentrações de nitrato mostrou que apenas os genes *ZmPHA1* e *ZmPHA2b2* foram diferencialmente expressos. Ambos apresentaram expressão diferencial nas raízes suporte, onde o gene *ZmPHA1* foi regulado negativamente, enquanto o gene *ZmPHA2b2* foi regulado positivamente. Entretanto, nenhum dos demais tecidos analisados apresentou expressão diferencial (Figura 5-D).

Figura 5 - Perfil da expressão diferencial dos genes da H⁺-ATPase MP em diferentes tipos de estresse, tais como infecção por patógeno (A), submersão (B), deficiência hídrica (C) e altas concentrações de Nitrogênio (D)

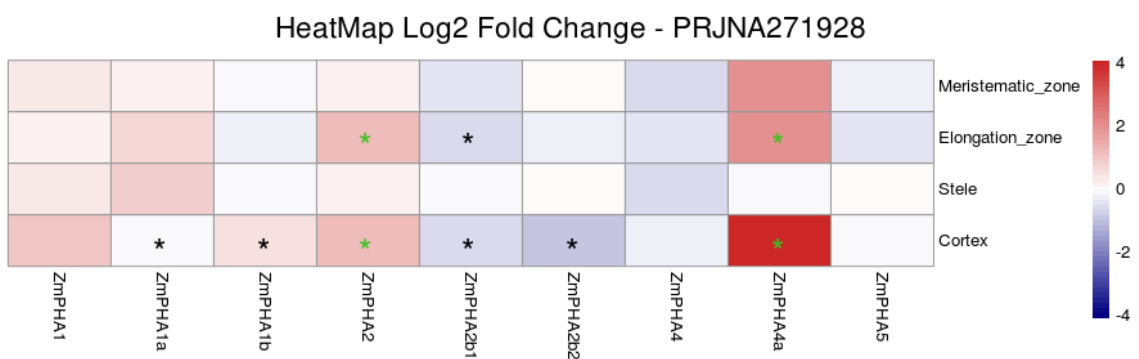
A



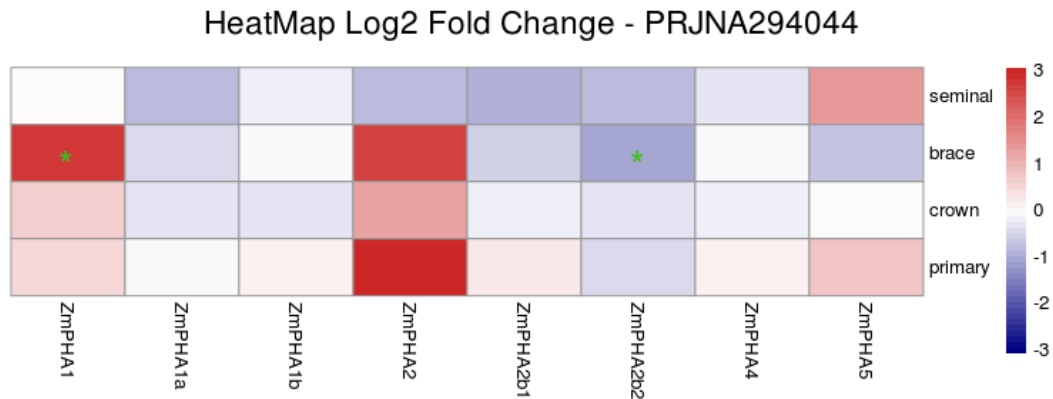
B



C



D



Fonte: elaborado pela autora.

4.3.2 Expressão *in silico* dos genes da H⁺-ATPase de membrana plasmática em diferentes tecidos durante o desenvolvimento.

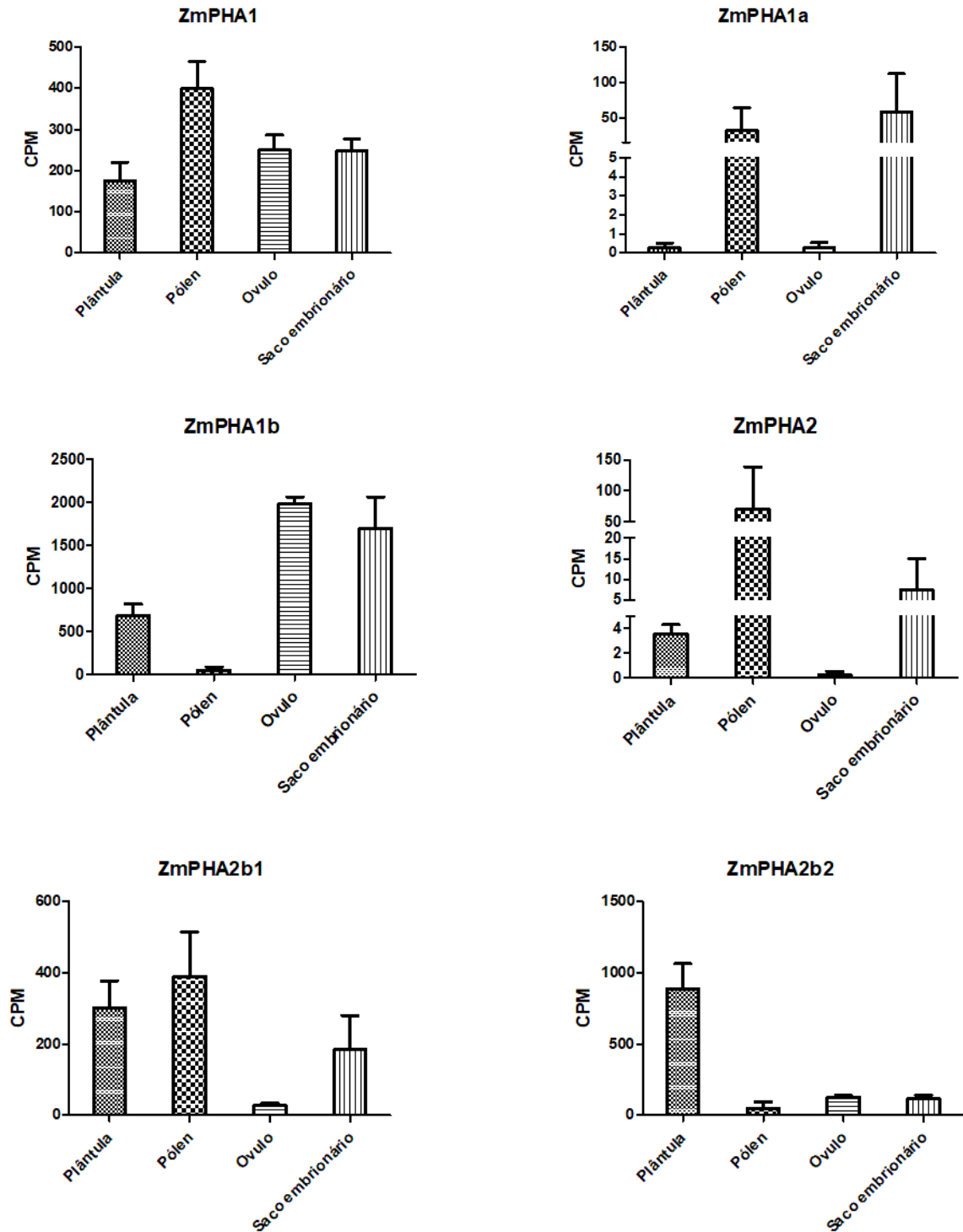
A análise *in silico* do perfil de expressão dos genes da H⁺-ATPase MP foi investigada em diferentes tecidos tais como: plântula, óvulo, saco embrionário, grão germinativo, folha madura, pólen, espiga, estilo-estigma, córtex e internódio durante o desenvolvimento do milho (*Zea mays* L.). Para este fim foram analisados os dados de RNA seq dos bioprojetos PRJNA80075 e PRJNA217053, onde foi observado que os genes *ZmPHA4b2* e *ZmPHA2a* não apresentaram CPM ≥ 2 em pelo menos três das bibliotecas do bioprojeto PRJNA80075. Este mesmo comportamento ocorreu com os genes *ZmPHA1a*, *ZmPHA4b2* e *ZmPHA2a* no bioprojeto PRJNA217053. Diante disso, os genes citados anteriormente não foram incluídos para análise de expressão diferencial pelo pacote DeSeq2.

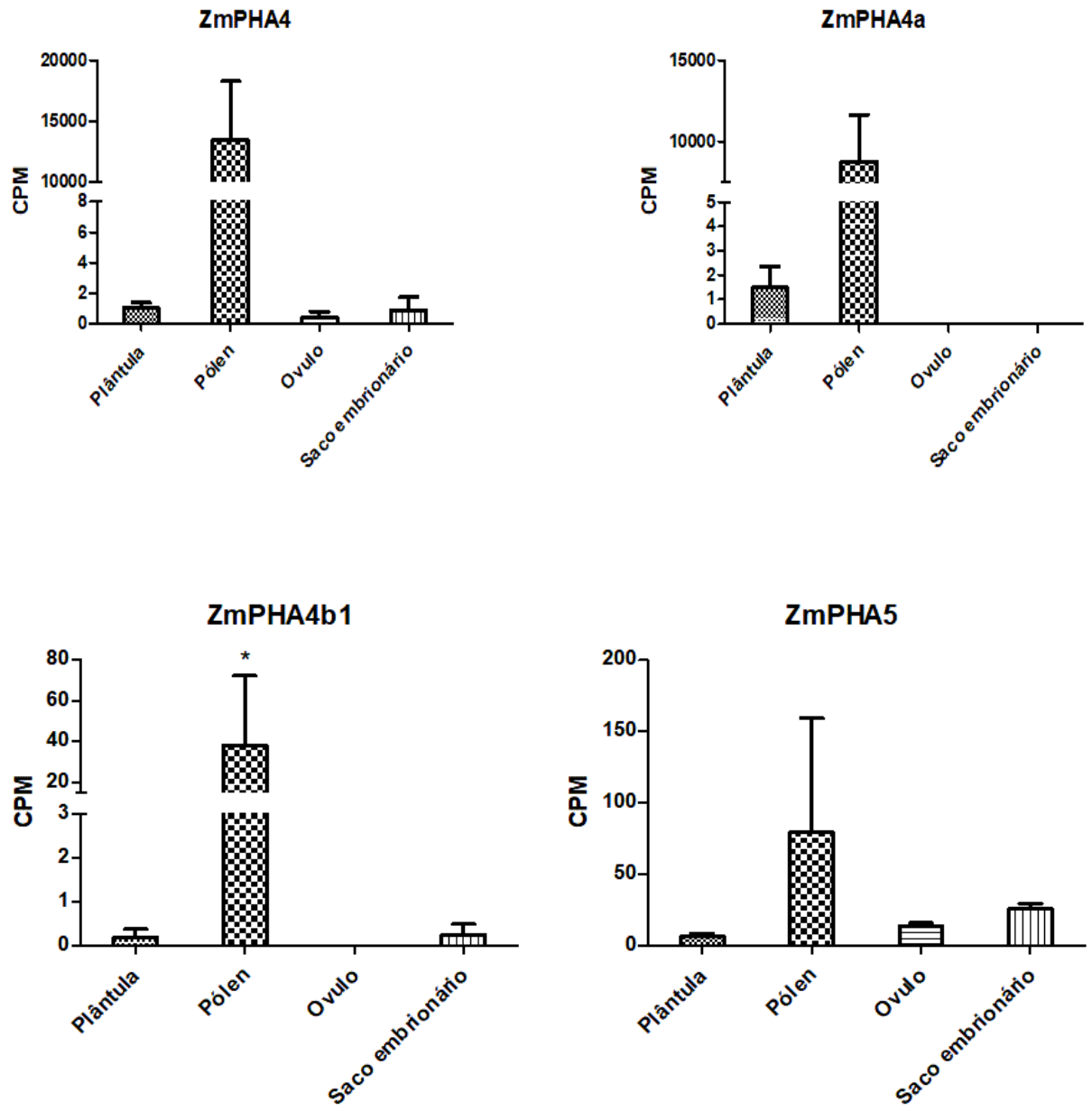
Ao analisar o perfil de expressão das bombas de prótons H⁺-ATPase nos tecidos da plântula, do pólen, do óvulo e do saco embrionário (bioprojeto PRJNA80075), observou-se que os genes *ZmPHA5*, *ZmPHA1*, *ZmPHA4b1*, *ZmPHA2* e *ZmPHA2b1* não apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os tecidos analisados. Entretanto, o gene *ZmPHA1b* apresentou um alto perfil de expressão no óvulo e saco embrionário (não havendo diferença estatística significativa entre esses tecidos) quando comparado com a plântula e o pólen (Figura 6). Os genes *ZmPHA4* e *ZmPHA4a* apresentaram um perfil de expressão

superior no tecido do pólen (13.452,2 e 8.749,9 CPM, respectivamente) quando comparado com os demais. Já o gene *ZmPHA2* teve uma maior expressão no tecido do pólen quando relacionado com os demais tecidos (Figura 6).

Investigando o padrão de expressão dos genes codificantes para H⁺-ATPase nos tecidos do grão germinativo, folha madura, pólen, espiga, estilo-estigma, córtex e internódio durante o desenvolvimento do milho (PRJNA217053) observou-se os genes *ZmPHA4b2* e *ZmPHA2* não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) entre os tecidos analisados. Contudo, o gene *ZmPHA5* teve maior expressão na folha madura (42.77 CPM) e na espiga (24.62 CPM) em relação aos outros tecidos. Enquanto, o *ZmPHA1* teve uma expressão no estilo-estigma superior aos demais tecidos, com exceção da espiga, onde não houve diferença estatística significativa. O gene *ZmPHA1b*, por sua vez teve uma maior expressão nos tecidos foliares maduros em relação aos demais tecidos. Já os genes *ZmPHA4* e *ZmPHA4a* tiveram um alto perfil de expressão nos tecidos do pólen quando comparado com os demais. O gene *ZmPHA2b1* teve maior perfil de expressão na folha madura em relação aos demais tecidos, com exceção do grão germinado e do pólen. Já o gene *ZmPHA2b2* apresentou alta expressão na folha madura e no grão germinado (não houve diferença significativa entre ambos) em relação aos outros tecidos (Figura 7).

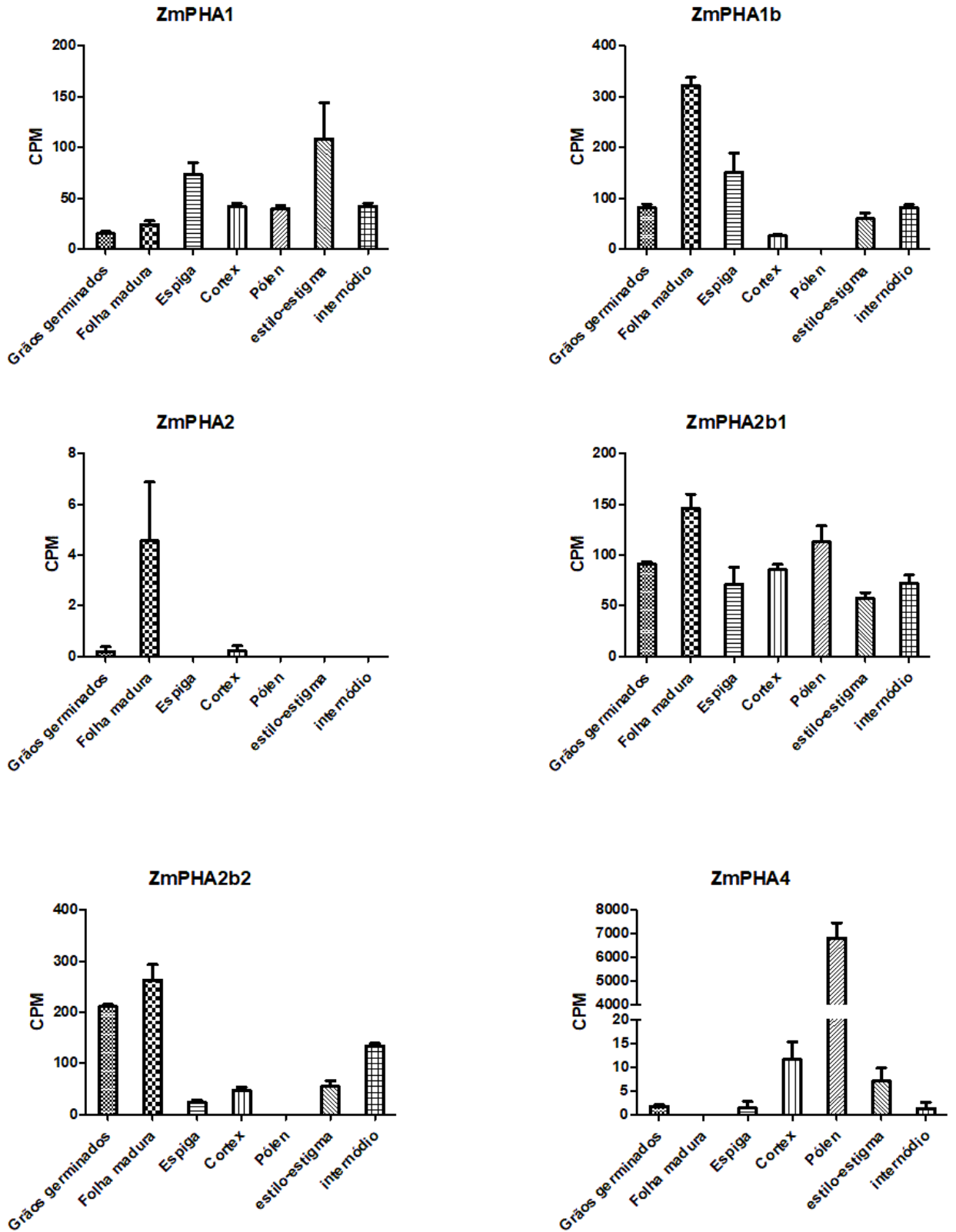
Figura 6 - Expressão dos genes da H^+ -ATPase MP nos tecido da plântula, pólen, óvulo e saco embrionário em *Zea mays* (bioprojeto PRJNA 80075).

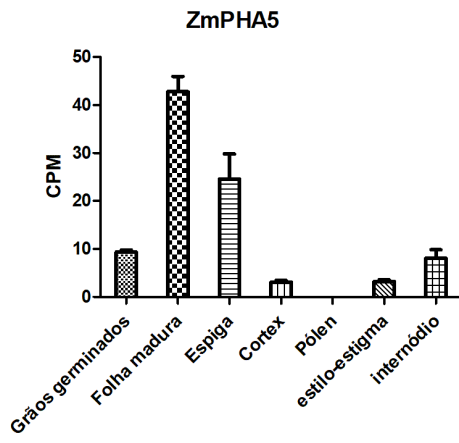
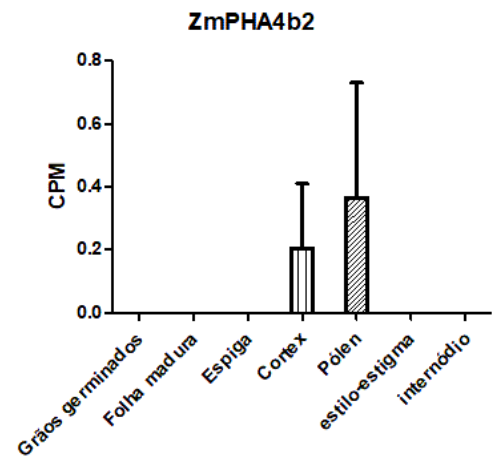
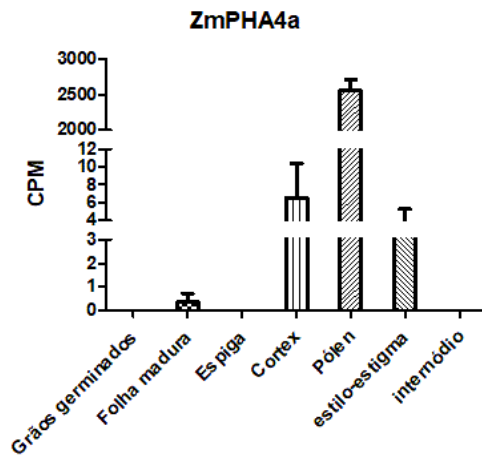




Fonte: elaborado pela autora.

Figura 7- Expressão dos genes da H^+ -ATPase MP nos tecidos do grão germinado, folha madura, espiga, córtex, pólen, estilo-estigma e internódio em *Zea mays* (bioprojeto PRJNA 217053).





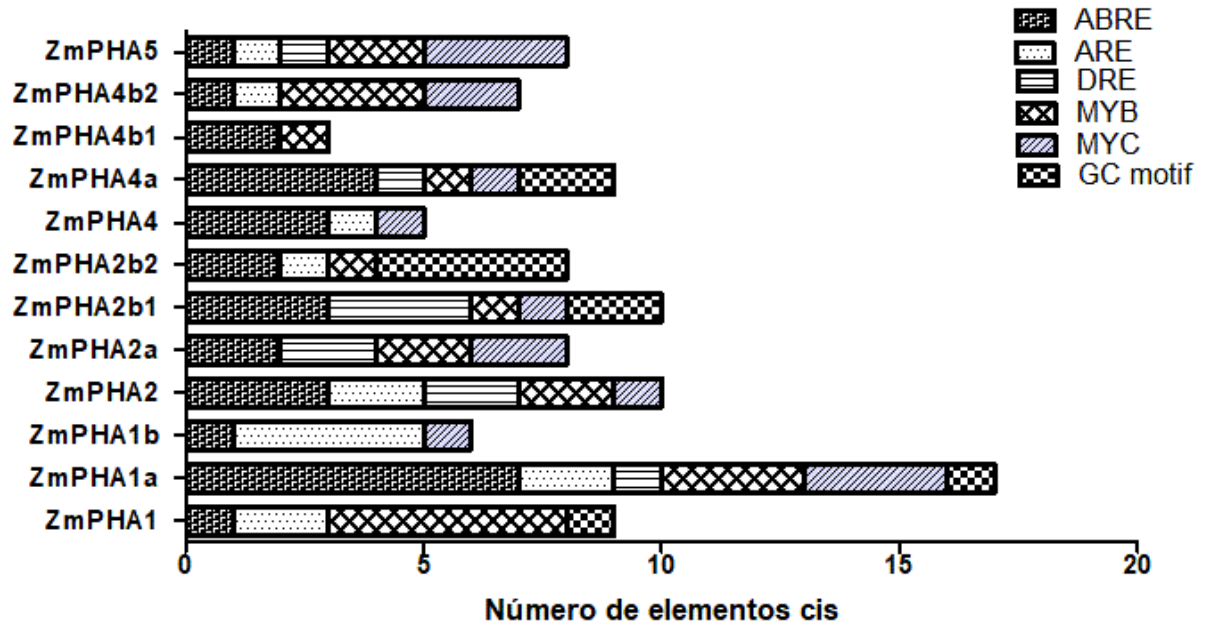
Fonte: elaborado pela autora

4.4 Análise da região promotora

A análise das regiões promotoras dos genes da H⁺ -ATPase MP em *Zea mays* revelou a presença de possíveis elementos *cis* regulatórios, divididos em seis grupos: ABRE (GCCGCGTGGC/CACGTG/ACGTG/), ARE (AAACCA), DRE (GCCGAC/ ACCGAGA), MYB (CAACCA/CAACAG), MYC (CATTG/CATGTG), GC-motif (CCCCCG) (Figura 7).

O elemento *cis* ABRE foi identificado em todos os genes analisados, sendo os genes *ZmPHA4a* e *ZmPHA1a* os que apresentaram a maior quantidade desse elemento *cis* com um total de quatro e sete, respectivamente. O elemento *cis* ARE, por sua vez, foi detectado nos genes *ZmPHA2*, *ZmPHA2b2*, *ZmPHA1*, *ZmPHA1b*, *ZmPHA4*, *ZmPHA4b2*, *ZmPHA5* com uma variação de um a quatro elementos, sendo o gene *ZmPHA1b* o que apresentou a maior quantidade. Já o elemento *cis* DRE foi encontrado nos genes *ZmPHA1a*, *ZmPHA2*, *ZmPHA2a* e *ZmPHA2b1* e *ZmPHA2b2*, *ZmPHA4a*, *ZmPHA5* com a diferença de um a três, sendo a maior quantidade identificada no gene *ZmPHA2b1*. Quando analisada a presença do elemento MYB, identificou-se sua ausência somente nos genes *ZmPHA4* e *ZmPHA1b*, apresentando uma variação de um a cinco, sendo a maior quantidade encontrada no gene *ZmPHA1b*. De modo semelhante o elemento *cis* MYC só esteve ausente nos genes *ZmPHA1*, *ZmPHA2b2*, *ZmPHA4b1* com uma variação de um a três elementos, com o maior valor encontrado nos genes *ZmPHA5* e *ZmPHA1a*. Os elementos *cis* GC-motif só foram detectados em quatro genes o *ZmPHA1*, *ZmPHA1a*, *ZmPHA4a* e *ZmPHA2b1*, com uma variação de 1 a 4 tendo sido encontrado o maior valor no gene *ZmPHA2*.

Figura 4 - Quantidade de elementos *cis* regulatórios ABRE (GCCGCGTGGC/ CACGTG/ ACGTG), ARE (AAACCA), DRE (GCCGAC / ACCGAGA), MYB (CAACCA / CAACAG), MYC (CATTG / CATGTG), GC-motif (CCCCCG).



Fonte: elaborado pela autora.

5 DISCUSSÃO

Os avanços no sequenciamento completo de genomas têm permitido a identificação de diferentes genes essenciais para o desenvolvimento dos organismos. Entre esses, os genes que codificam as bombas de prótons H^+ -ATPase de membrana plasmática presentes em fungos e plantas. O estudo desses genes em plantas permitiu a identificação de onze genes em *Arabidopsis thaliana* (ARANGO *et al.*, 2003), dez em *Oryza sativa* (BAXTER *et al.*, 2003) e *Zea mays* (TODA *et al.*, 2016) bem como doze em *Sorghum bicolor* (ZENG *et al.*, 2016). O presente trabalho identificou uma variação de cinco a doze genes nas espécies das ordens Alismatales, Asparagales, Arecales e Poales, resultado semelhante ao descrito na literatura. Entretanto, na ordem Zingiberales, representada pela espécie *Musa acuminata*, foi identificado um total de 18 genes, um número superior ao das demais espécies. Uma provável explicação para esse aumento no número de genes identificados em *Musa acuminata* é a presença de um grande número de elementos retrotransponíveis e os eventos de duplicação de genoma como descrito por D'Hont *et al.* (2014). Desse modo, os dados expostos acima reforçam a afirmativa de que as bombas de prótons H^+ -ATPase são codificadas por uma família multigênica (PALMGREEN, 2001).

Após a identificação, as estruturas das sequências gênicas foram caracterizadas onde foi encontrada uma variação de um a 20 íntrons, bem como janelas de leitura aberta (ORFs) que continham entre 2.571 a 3.597 pares de base (pb) e codificando proteínas contendo entre 857 a 976 aminoácidos. Resultados semelhantes foram relatados em estudos anteriores com *Sorghum bicolor* onde foi demonstrada a presença de dois a 20 íntrons, ORFs contendo 3.184 a 9.919 pb e proteínas apresentando entre 874 a 1004 aminoácidos (ZENG *et al.*, 2016).

A análise filogenética, por sua vez, revelou que as sequências gênicas foram distribuídas em cinco clados distintos identificados como clado I-V. Essa subdivisão das sequências da H^+ -ATPase nesses diferentes clados, foi relatada nos trabalhos de Toda *et al.* (2016) quando analisou as relações filogenéticas entre as espécies *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Marchantia polymorpha* e *Chlamydomonas reinhardtii*. Resultado semelhante, também foi identificado na árvore filogenética criada por Arango *et al.* (2003) com as sequências de aminoácidos das espécies *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana plumbaginifolia* e *Oryza sativa*.

A análise da árvore filogenética juntamente com a caracterização dos genes demonstrou que os clados mais distantes do grupo ancestral apresentaram uma maior quantidade de sequências gênicas. Foi, também, identificada uma relação entre os clados formados e a quantidade de exons/íntrons presente em cada gene, característica anteriormente descrita por Arango *et al.*(2003) ao analisar as relações filogenéticas entre os genes codificantes para a H⁺ -ATPase MP.

Os clados III e V apresentaram uma menor quantidade de sequências protéicas representativas de cada espécie (12 e 14, respectivamente). No clado III não foram identificados sequências protéicas das ordens Asparagales nem das espécies pertencentes à subfamília Panicoideae da ordem Poales. Já no clado V estiveram ausentes as sequências protéicas das espécies *Musa acuminata* (ordem Zingiberales) e *Oryza sativa* (ordem Poales). Esse fenômeno indica a ocorrência de prováveis eventos de deleção das H⁺ -ATPase3 (clado III) e H⁺ -ATPase5 (clado V) nas espécies descritas anteriormente. Os clados I, II e IV apresentaram um aumento significativo no número das sequências protéicas representativas de cada espécie (46, 55 e 51 genes, respectivamente), sugerindo a ocorrência de possíveis eventos de duplicação como demonstrado pelas espécies *Brachypodium distachyon* (clado I), *Zostera marina* (clado IV), *Amborella trichopoda* (clado II), *Oryza sativa* (clados I e IV), *Phoenix dactylifera* (clados I e II), *Zea mays*; *Zoysia japonica*; *Ananas comosus* (clados II e IV), bem como *Musa acuminata* e *Arabidopsis thaliana* (nos clados I, II e IV) (Figura 3). Eventos semelhantes foram anteriormente reportados nas eudicotiledôneas *Arabidopsis* e *Nicotiana plumbaginifolia* (PALMGREN, 2001). Levando em consideração a ocorrência de eventos de duplicação na angiosperma basal *Amborella trichopoda* e em diferentes espécies de monocotiledôneas, sugere-se que a ocorrência de duplicação dos genes da H⁺ -ATPase MP ocorreu no início da evolução das plantas antes da separação entre as monocotiledôneas e eudicotiledôneas.

A ocorrência de eventos de duplicação e deleção de genes, como sugerido para as bombas de prótons H⁺ -ATPase MP, está intimamente relacionada com a presença de elementos móveis formados por sequências de DNA conhecidos como transposons que apresentam a capacidade de alterar sua posição dentro do genoma (YU; ZHANG; PETERSON, 2011). Esses elementos são divididos em duas classes principais. A classe I, também conhecidos como retrotransposons, utiliza um mecanismo de transposição conhecido como “copiar e colar”, envolvendo um RNA intermediário. Esse mecanismo possibilita a ocorrência de genes em diferentes posições no genoma, fenômeno conhecido como

duplicação. A classe tipo II, por sua vez, utiliza o mecanismo de “cortar e colar”, onde uma região do DNA é transposta de uma posição no genoma para outro, sendo uma das principais causas dos eventos de deleção de genes (LISCH, 2013). Desse modo, a presença dos elementos de transposição desempenha um importante papel na evolução do gene e reorganização do genoma (YU; ZHANG; PETERSON, 2011), fato demonstrado no estudo sobre a presença de elementos de transposição durante o processo de domesticação do arroz (NAITO *et al.*, 2006).

Ao analisar a relação entre o número de íntrons presente nas sequências agrupadas em cada clado identificou-se que os cladogramas III e V apresentaram, em sua maioria, sequências que apresentaram entre 17 e 20 íntrons. Já os genes agrupados nos cladogramas I, II e IV obtiveram a seguinte distribuição: o clado I agrupou em sua maioria (37 sequências) os genes com 20 íntrons, o clado II, por sua vez, apresentou uma variação de 9 a 15 íntrons. Já o clado IV, formou dois subgrupos (1 e 2). O subgrupo 1 reuniu as sequências com a menor quantidade de íntrons (dois a cinco), e no subgrupo 2 onde a maioria dos genes continham de oito a 14 íntrons. A redução no número de íntrons observada nos cladogramas II e V sugere a ocorrência de possíveis eventos de deleção de íntrons, ocorrendo em maior intensidade no subgrupo 1 do clado IV (Configuração exon/intron, anexo 1). Essa redução no número de íntrons foi anteriormente descrita por Arango *et al.* (2003) ao analisar as sequências gênicas da H⁺ -ATPase MP em *Oryza sativa*. Ele identificou nas sequências que apresentavam somente um e dois íntrons, a presença da cauda Poli T (após o códon de parada) sugerindo a ocorrência dos eventos de transcrição reversa do RNA, sendo este evento intimamente associado com os eventos de deleção de íntrons (ZHANG *et al.*, 2014).

No presente estudo verificou-se que a maioria dos membros codificantes para as bombas de próton H⁺ -ATPase em plantas de milho (*Zea mays*) foram expressos nos diferentes tecidos analisados durante o desenvolvimento e sobre as diferentes condições de tratamento. Entretanto a análise do perfil de expressão diferencial desses genes nas plantas de milho quando submetidas a condições de estresse, tanto de origem biótica como abiótica, revelou que os genes pertencentes ao clado V não foram diferencialmente expressos em nenhuma das condições analisadas. Contudo, a maioria dos genes agrupados no clado I, com a exceção do gene *ZmPHA1b* quando submetido a estresse por submersão, foram regulados negativamente. Enquanto que a maioria dos genes regulados positivamente foi agrupada nos cladogramas II e IV

Ao analisar os clados citados observou-se que os genes agrupados no clado I foram identificados como genes ortólogos das H⁺-ATPases4 e 11 de *Arabidopsis thaliana*. Estudos anteriores já haviam demonstrado que as H⁺-ATPases4 apresentam uma maior proximidade com a H⁺-ATPases11 do que com as demais bombas de prótons (VITART *et al.*, 2001), resultado semelhante ao encontrado no presente trabalho. Tem-se descrito na literatura que os genes codificantes para H⁺-ATPases4 de *Arabidopsis* apresentam alto padrão de expressão quando submetido a estresse salino (VITART *et al.*, 2001). Entretanto, no presente estudo identificou-se que o seu gene ortólogo (*ZmPHA1b*) foi regulado positivamente quando submetido ao estresse por submersão no cultivar M162w (previamente identificado como tolerante a essa condição) em ambos os períodos analisados. Entretanto, ao analisar as demais condições de estresse identificou-se que os genes que apresentaram um perfil diferencial de expressão e que eram pertencentes ao clado I foram regulados negativamente. Assim, sugere-se que o gene *ZmPHA1b* está associado aos mecanismos de aclimação das plantas de milho as condições de estresse por submersão.

A maioria dos genes da H⁺-ATPase MP de *Zea mays* que foram agrupados nos clados II e IV foi regulado positivamente nas condições de estresse analisadas, ou seja, nas infecções por patógenos, nos estresses hídricos (submersão e seca) e por excesso de nitrato no solo. No clado IV, identificamos a presença das H⁺-ATPase6, 8 e 9 de *Arabidopsis thaliana*. A análise do perfil de expressão desses parálogos revelou que as H⁺-ATPases6 e 9 são predominantemente expressas nos protoplastos de células guarda, atuando na extrusão do íon H⁺ em resposta a exposição a luz azul (UENO *et al.*, 2005). De modo semelhante, os genes de *Zea mays* que mantiveram relações de ortologia com as H⁺-ATPases6 e 9 foram regulados positivamente quando expostos a estresse hídrico (submersão e seca) e a altas concentrações de nitrato, ou seja, dentre as condições analisadas, os genes codificantes para as bombas de prótons foram positivamente responsivos a mais de um tipo de estresse, diferindo dos genes pertencentes ao clado IV.

No clado II, por sua vez, identificou-se a presença das H⁺-ATPases1, 2, 3 e 5 de *Arabidopsis thaliana*. Estudos sobre os padrões de expressão desses genes revelou que as H⁺-ATPases1, 2 e 3 são expressas em todos os tecidos, já o gene *AtPHA5* foi identificado nas células dos protoplastos de células guarda semelhantes as *AtPHA6* e 9 (UENO *et al.*, 2005). A análise da expressão relativa dos genes da H⁺-ATPases1, 2 e 3 presentes nas raízes de *Arabidopsis*, quando submetidas a altas concentrações de NaCl, demonstrou um aumento no nível de expressão desses genes, entretanto após 24hs da indução do estresse os genes 1 e 2

retornaram a condição original, enquanto, que o nível dos transcrito das H^+ -ATPase3 permaneceu elevado (BOSE *et al.*, 2015), indicando que este gene está fortemente relacionado com aclimação da planta a esta condição. Ao investigar o gene da H^+ -ATPase2 em raízes de *Arabidopsis* observou-se que este apresentou um alto perfil de expressão quando submetido a diferentes concentrações de nitrogênio, indicando que este gene, através do controle da homeostase do pH celular durante o crescimento, é essencial para o bom desenvolvimento da planta (MŁODZIŃSKA *et al.*, 2015). De modo semelhante, o presente trabalho identificou que o gene *ZmPHA2b2* foi regulado positivamente nas raízes suporte de milho, quando submetido a altas concentrações de nitrato, assim sugere-se uma relação de ortologia e conservação de função entre os gene *ZmPHA2b2* e *AHA2*. Vale ressaltar que a maioria dos genes agrupados no clado II também foram regulados positivamente quando expostos aos demais estresses analisados, ou seja, o gene *ZmPHA2* foi expresso positivamente quando submetido a deficiência hídrica, enquanto o gene *ZmPHA2b1* foi positivamente expresso em infecções por patógenos e estresse por submersão. Desse modo, sugere-se que os genes de *Zea mays* agrupados no clado II são essenciais para a sobrevivência e bom desenvolvimento da planta quando exposta a essas condições.

Ao analisar comparativamente o padrão de expressão dos genes da H^+ -ATPases MP em diferentes tecidos de milho em desenvolvimento mostrou que nos tecidos embrionários o gene *ZmPHA1b* foi bem expresso no óvulo e saco embrionário, enquanto o gene o *ZmPHA2* teve uma maior expressão nos tecidos da plântula. Já os genes *ZmPHA2b1*, *ZmPHA2b2* e *ZmPHA5* apresentaram uma alta expressão em folhas maduras. Além disso, os genes *ZmPHA2b1* e *ZmPHA2b2* também foram bem expressos nos tecidos dos grãos germinados. O gene *ZmPHA1*, por sua vez, teve uma maior expressão no estilo-estigma, enquanto os genes *ZmPHA4* e *ZmPHA4a* apresentaram uma alta expressão nos tecidos do pólen em ambos os bioprojetos analisados.

Estudos sobre a distribuição da H^+ -ATPase MP juntamente com o do ácido indol-3-ácetico (AIA) e da proteína da ligação a auxina1 (ABP1) (que atuam promovendo a ativação dessa bomba de próton) em células do ovário de tabaco demonstrou que a H^+ -ATPase MP desempenha um importante papel no desenvolvimento do óvulo e do saco embrionário, por atuar na acidificação do apoplasto para que ocorra o afrouxamento da parede celular, permitindo o processo de alongação celular e o conseqüente crescimento da célula (CHEN; DENG; ZHAO, 2012). Desse modo, sugere-se que a alta expressão do gene *ZmPHA1b* em tecidos do óvulo e do saco embrionário está relacionada com crescimento e

desenvolvimento dessas estruturas reprodutivas em plantas. De modo análogo, a ativação da H^+ -ATPase5 MP em raízes de plântulas de *Arabidopsis* foi essencial para o estabelecimento de um gradiente de prótons na superfície da raiz promovendo o processo de alongação celular e o conseqüente crescimento da raiz (HARUTA *et al.*, 2018). O presente estudo demonstrou que o gene *ZmPHA2*, que foi filogeneticamente agrupado com o gene da H^+ -ATPase2 de *Arabidopsis*, também apresentou um alto padrão de expressão em tecidos de plântula sugerindo uma relação de ortologia entre esses genes.

A ativação das bombas de protons H^+ -ATPase em tecidos foliares está associada ao processo de carregamento e descarregamento do floema, além do controle da abertura e fechamento estomático (PALMGREN, 2001). O presente trabalho identificou que os genes parálogos *ZmPHA2b1* e *ZmPHA2b2*, juntamente com o gene *ZmPHA2* apresentaram um alto perfil de expressão em folha maduras. Esses parálogos foram agrupados no clado II juntamente com as H^+ -ATPase1, 2, 3 e 5 de *Arabidopsis*, enquanto que o gene *ZmPHA5* foi agrupado no clado V com a H^+ -ATPase7 de *Arabidopsis*. A análise do perfil de expressão dos genes por RT-PCR em folhas de *Arabidopsis* demonstrou que as H^+ -ATPase1, 2, 3, 5, 7, 8, 10, e 11 foram expressas, entretanto, as H^+ -ATPase1, 2, 3 apresentaram uma maior quantidade de transcritos em relação as demais H^+ -ATPases. No entanto, a análise de genes repórteres revelou que o gene H^+ -ATPases3 foi expresso em células companheiras do floema (GAXIOLA; PALMGREN; SCHUMACHER, 2007). Outro importante gene encontrado em folhas foi o gene da H^+ -ATPase5 que foi predominantemente expresso em células guardas (UENO *et al.*, 2005).

A análise da expressão revelou que os genes *ZmPHA2b1* e *ZmPHA2b2* (90,91 e 211,71 CPM, respectivamente) apresentaram uma maior expressão nos tecidos de grãos germinados quando comparados com os demais genes analisados. Dados publicados relatam que a H^+ -ATPase MP desempenha um papel importante no processo de germinação de sementes por atuar na acidificação das paredes celulares, etapa necessária ao início da alongação celular em embriões (OBROUCHEVA, 2017). Desse modo, sugere-se que os genes *ZmPHA2b1* e *ZmPHA2b2* exercem um papel fundamental no processo de germinação de sementes de milho.

O gene *ZmPHA1*, por sua vez, teve uma maior expressão nos estilos-estigma (cabelo do milho). Estas estruturas reprodutivas são receptivas ao grão de pólen viabilizando o processo de fecundação do óvulo, sendo considerada uma estrutura essencial para a

reprodução bem sucedida (FANCELLI, 2015). Não é claro como a H^+ -ATPase atua em estilos-estigma de milho, entretanto, essa bomba de prótons é responsável pelo fornecimento da energia necessária para o bom desenvolvimento de espiguetas em plantas de arroz, permitindo que o processo de fecundação seja bem sucedido (ZHANG *et al.*, 2018).

Os genes *ZmPHA4* e *ZmPHA4a* apresentaram uma alta expressão nos tecidos do pólen em ambos os bioprojetos analisados. Interessantemente, esses genes estão agrupados no clado IV juntamente com as H^+ -ATPases 6, 8 e 9 de *Arabidopsis thaliana*. A análise do padrão de expressão das isorformas da H^+ -ATPases MP em diferentes tecidos de *Arabidopsis* mostrou que H^+ -ATPases 8 apresentou a maior quantidade de transcritos no pólen, seguida pelas H^+ -ATPases 7, 6 e 9 (UENO *et al.*, 2005; LANG *et al.*, 2013). Esses genes apresentaram uma distribuição assimétrica nos tecidos do pólen. Isso foi relacionado com a extrusão diferencial dos íons H^+ ao longo do tubo, sendo este processo relacionado com o direcionamento do crescimento do tubo polínico (LEFEBVRE *et al.*, 2005). Outra importante função da H^+ -ATPase MP é promover a acidificação do ambiente extracelular permitindo o processo de alongação celular, fenômeno já descrito anteriormente em outros tecidos vegetais (LEFEBVRE *et al.*, 2005; LANG *et al.*, 2013). Desse modo, sugere-se que a presença dos genes *ZmPHA4* e *ZmPHA4a* são essenciais para o crescimento dos grãos de pólen e desenvolvimento do tubo polínico.

Análise da presença dos elementos *cis* regulatórios juntamente com o perfil diferencial de expressão dos genes submetidos a condições de estresse revelou que o elemento ABRE que é envolvido nas respostas ao ácido abscísico (ABA) esteve presente em todos os genes analisados, entretanto, a maior quantidade de elementos foi identificado no gene *ZmPHA1a* seguido do gene *ZmPHA4a*. O gene *ZmPHA1a* foi regulado negativamente em folhas do cultivar B73 (cultivar sensível ao estresse por submersão) nos períodos de 72 e 24 horas após a submissão ao estresse por submersão. Já o gene *ZmPHA4a* foi regulado positivamente no córtex e zona de alongação quando submetido ao estresse por deficiência hídrica. Trabalhos anteriores relatam que a exposição ao ácido abscísico causa alterações nos processos de ativação da bomba de prótons H^+ -ATPase MP como demonstrado em raízes de arroz submetidas a chuva ácida e ao ABA exógeno, onde foi observado que raízes expostas a chuva ácida e ao ABA tiveram uma redução da atividade da H^+ -ATPase MP quando comparada com as raízes que foram expostas somente a chuva ácida (LIU *et al.*, 2018). No entanto, quando as células epidérmicas das raízes de *Arabidopsis thaliana* foram expostas ao ABA tiveram uma inibição da H^+ -ATPase MP (PLANES *et al.*, 2014). Desse modo, sugere-se

que a presença do elemento ABRE está associada, a menor expressão do gene *ZmPHA1a* nas folhas do cultivar B73, entretanto, no *ZmPHA4a* nas regiões do córtex e zona de alongação quando submetidos a deficiência hídrica foi identificado um efeito contrário ao observado no gene *ZmPHA1a* quando exposto ao estresse por submersão.

O elemento ARE, que é um regulador essencial para as condições de anóxia, apresentou-se em maior quantidade no gene *ZmPHA1*. Ao analisar o perfil diferencial de expressão desse gene em folhas de milho submetidas ao estresse por submersão, sendo este um dos principais tipos de estresse indutores ao estresse por anóxia (CAMPBELL *et al.*, 2015), observou-se que esse gene foi regulado negativamente no cultivar sensível a esse estresse e positivamente no cultivar tolerante, indicando que este elemento regulador está associado aos mecanismos de aclimação das plantas a condição de estresse. Outro elemento *cis* associado a condições de anóxia é o GC- motif que se apresentou em maior quantidade no gene *ZmPHA2*. Este gene só foi diferencialmente expresso no estresse por deficiência hídrica sendo regulado positivamente nas regiões do córtex e zona de alongação.

Os elementos *cis* MYB, MYC juntamente com o elemento responsivo a desidratação (DRE) foram relacionados com a expressão de genes responsivos a estresse por deficiência hídrica (ABE *et al.*, 1997; NARUSAKA *et al.*, 2003). O presente trabalho identificou que estes elementos apresentaram-se em maior quantidade nos genes *ZmPHA1* (MYB), *ZmPHA1a* (MYC) e *ZmPHA2b1* (DRE). Entretanto, ao analisar o perfil de expressão diferencial dos genes da H⁺-ATPase MP sobre as condições de estresse por deficiência hídrica, nenhum dos genes citados foi diferencialmente expresso. No entanto, ao analisar o estresse por submersão identificou-se que os genes *ZmPHA1* (MYB), *ZmPHA1a* (MYC) foram regulados negativamente em ambos os cultivares B73 (sensível) e M162w (tolerante). Já o gene *ZmPHA2b1* (DRE) foi regulado positivamente no cultivar sensível e negativamente no cultivar tolerante a condição de estresse. O presente gene também foi regulado positivamente durante a infecção pelo fungo causador da doença da mancha cinza. Desse modo, observa-se que os elementos MYB e MYC não foram associados aos mecanismos de aclimação das plantas aos estresses analisados. O elemento DRE, no entanto, foi relacionado como responsável ao estresse por submersão no cultivar B73. O mecanismo como os elementos *cis* estão relacionados à expressão dos genes da H⁺-ATPase MP face a diferentes estresses ainda não é claro, sendo necessário estudos mais detalhados para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na indução desses genes quando submetidos a condições ambientais desfavoráveis, bem como durante o crescimento e desenvolvimento

vegetal.

6 CONCLUSÃO

As bombas de prótons H⁺ -ATPase MP em monocotiledôneas são codificadas por uma família multigênica que apresentam um número variável de genes (de cinco a 18) a depender da espécie analisada. As sequências gênicas foram agrupadas em cinco subfamílias distintas nomeadas de I a V. Destes grupos os cladros I, II e IV, foram os que apresentaram o maior número de sequências gênicas, além da presença dos eventos de duplicação de genes.

Identificou-se também que a maioria dos genes agrupados em cada clado apresentou similaridades na quantidade de introns presentes em cada sequência gênica. Desse modo, foi identificado que os cladros III e V apresentaram, em sua maioria, sequências que apresentaram entre 17 e 20 introns. Enquanto que o clado I agrupou em sua maioria os genes com 20 íntrons, já clado II por sua vez apresentou uma variação de 9 a 15 íntrons. Entretanto, o clado IV, formou dois subgrupos (1 e 2). O subgrupo 1 reuniu as sequências com a menor quantidade de introns (dois a cinco), e no subgrupo 2 onde a maioria dos genes continham de oito a 14 introns. Dessa maneira, foi identificada uma redução no número de íntrons observada nos cladros II e V sugerindo a ocorrência de possíveis eventos de deleção de íntrons, ocorrendo em maior intensidade no subgrupo 1 do clado IV.

A análise de expressão *in silico* revelou que a maioria dos membros gênicos foram constitutivamente expressos em milho e alguns membros foram responsivos a condições de estresse. Os genes agrupados no clado I, em sua maioria, foram regulados negativamente, enquanto, que a maioria dos genes agrupados nos cladros II e IV foram regulados positivamente. Contudo, o gene agrupado no clado V não foi responsivo a nenhuma das condições. Já o padrão de expressão dos genes nos diferentes tecidos durante o desenvolvimento, revelou que os genes *ZmPHA4* e *ZmPHA4a* foram expressos predominantemente nos tecidos do pólen enquanto os demais genes apresentaram expressão variável a depender do tecido estudado. Assim, as H⁺ -ATPases MP apresentam diferentes propriedades reguladoras que combinadas com a ação dos diferentes elementos *cis* permitem que as células vegetais sejam capazes de sobreviver, crescer e desenvolver-se quando expostas a alterações fisiológicas e a diferentes condições ambientais.

REFERÊNCIAS

- ABE, H.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; URAO, T.; IWASAKI, T.; HOSOKAWA, D.; SHINOZAKI, K. Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought-and abscisic acid-regulated gene expression. **The Plant Cell**, [s.l.], v. 9, n. 10, p. 1859-1868, 1997.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, [s.l.], v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ANDERS, S.; PYL, P. T.; HUBER, W. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 31, n. 2, p. 166-169, 2015.
- ANDREWS, S. FastQC. **A quality control tool for high throughput sequence data**, [s.l.], v. 370, 2010.
- ARANGO, M.; GEVAUDANT, F.; OUFATTOLE, M.; BOUTRY, M. The plasma membrane proton pump ATPase: the significance of gene subfamilies. **Planta**, [s.l.], v. 216, p. 355–365, 2003.
- AXELSEN, K. B.; PALMGREN, M. G. Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in Arabidopsis. **Plant physiology**, [s.l.], v. 126, n. 2, p. 696-706, 2001.
- BAXTER, I.; TCHIEU, J.; SUSSMAN, M.; BOUTRY, M.; PALMGREN, M.; GRIBSKOV, M.; HARPER, J.; AXELSEN, K. Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in Arabidopsis and rice. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 132, p. 618-828, 2003.
- 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.
- BOSE, J.; RODRIGO-MORENO, A.; LAI, D.; XIE, Y.; SHEN, W.; SHABALA, S. Rapid regulation of the plasma membrane H⁺-ATPase activity is essential to salinity tolerance in two halophyte species, *Atriplex lentiformis* and *Chenopodium quinoa*. **Annals of botany**, [s.l.], v. 115, n. 3, p. 481-494, 2014.
- BOWMAN, E. J.; BOWMAN, B. J. V-ATPases as drug targets. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, [s.l.], v. 37, n. 6, p. 431-435, 2005.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. John Wiley & Sons, 2015
- CAMPBELL, M. T.; PROCTOR, C. A.; DOU, Y.; SCHMITZ, A. J.; PHANSAK, P.; KRUGER, G. R.; ZHANG, C.; WALIA, H. Genetic and molecular characterization of submergence response identifies Subtol6 as a major submergence tolerance locus in maize. **PLoS One**, [s.l.], v. 10, n. 3, p. e0120385, 2015.
- CHEN, D.; DENG, Y.; ZHAO, J. Distribution and change patterns of free IAA, ABP 1 and PM H⁺-ATPase during ovary and ovule development of *Nicotiana tabacum* L. **Journal of plant physiology**, [s.l.], v. 169, n. 2, p. 127-136, 2012.

- 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.
- D'HONT, A.; DENOEUDE, F.; AURY, J. M.; BAURENS, F. C.; CARREEL, F.; GARSMEUR, O.; NOEL, B.; BOCS, S.; DROC, G.; ROUARD, M.; SILVA, C.; JABBARI, K.; CARDI, C.; POULAIN, J.; SOUQUET, M.; LABADIE, K.; JOURDA, C.; LENGELLÉ, J.; RODIER-GOUD, M.; ALBERTI, A.; BERNARD, M.; CORREA, M.; AYYAMPALAYAM, S.; MCKAIN, M. R.; LEEBENS-MACK, J.; BURGESS, D.; FREELING, M.; MBÉGUIÉ-A-MBÉGUIÉ, D.; CHABANNES, M.; WICKER, T.; PANAUD, O.; BARBOSA, J.; HRIBOVA, E.; HESLOP-HARRISON, P.; HABAS, R.; RIVALLAN, R.; FRANCOIS, P.; POIRON, C.; KILIAN, A.; BURTHIA, D.; JENNY, C.; BAKRY, F.; BROWN, S.; GUIGNON, V.; KEMA, G.; DITA, M.; WAALWIJK, C.; JOSEPH, S.; DIEVART, A.; JAILLON, O.; LECLERCQ, J.; ARGOUT, X.; LYONS, E.; ALMEIDA, A.; JERIDI, M.; DOLEZEL, J.; ROUX, N.; RISTERUCCI, A.; WEISSENBACH, J.; RUIZ, M.; GLASZMANN, J.; QUÉTIÉ, F.; YAHIAOUI, N.; WINCKER, P. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. **Nature**, [s.l.], v. 488, n. 7410, p. 213, 2012.
- DIEZ, M.; ZIMMERMANN, B.; BÖRSCH, M.; KÖNIG, M.; SCHWEINBERGER, E.; REUTER, R.; FELEKYAN, S.; KUDRYAVTSEV, V.; SEIDEL, C. A. M.; GRÄBER, P. Proton-powered subunit rotation in single membrane-bound F₀F₁-ATP synthase. **Nature Structural and Molecular Biology**, [s.l.], v. 11, n. 2, p. 135, 2004.
- DUBY, G.; BOUTRY, M. The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. **Pflügers Archiv**, [s.l.], v. 457, p. 645-55, 2009.
- FANCELLI, A. L. Manejo baseado na fenologia aumenta eficiência de insumos e produtividade. **Visão agrícola**, Piracicaba, nº13, p.24-29, 2015.
- FLOWERS, T. J. Improving crop salt tolerance. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v.55, p.307-319, 2004.
- GAXIOLA, R. A.; PALMGREN, M. G.; SCHUMACHER, K. Plant proton pumps. **FEBS Letters**, [s.l.] v. 581, p. 2204-2214, 2007
- HAAK, D. C.; FUKAO, T.; GRENE, R.; HUA, Z.; IVANOV, R.; PERRELLA, G.; LI, S. Multilevel regulation of abiotic stress responses in plants. **Frontiers in plant science**, [s.l.], v. 8, p. 1564, 2017.
- HARUTA, M.; TAN, L. X.; BUSHEY, D. B.; SWANSON, S. J.; SUSSMAN, M. R. Environmental and genetic factors regulating localization of the plant plasma membrane H⁺-ATPase. **Plant physiology**, [s.l.], v. 176, n. 1, p. 364-377, 2018.
- HARUTA, M.; GRAY, W. M.; SUSSMAN, M. R. Regulation of the plasma membrane proton pump (H⁺-ATPase) by phosphorylation. **Current Opinion in Plant Biology**, [s.l.], v. 28, p. 68-75, 2015.

- HIGO, K.; UGAWA, Y.; IWAMOTO, M.; KORENAGA, T. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. **Nucleic acids research**, [s.l.], v. 27, n. 1, p. 297-300, 1999.
- INESI, G.; PILANKATTA, R.; TADINI-BUONINSEGNI, F. Biochemical characterization of P-type copper ATPases. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 463, n. 2, p. 167-176, 2014.
- JANICKA-RUSSAK, M.; KABAŁA, K. The role of plasma membrane H⁺-ATPase in salinity stress of plants. In: **Progress in Botany**. Springer, Cham, p. 77-92. 2015.
- JANICKA-RUSSAK, M.; KABAŁA, K.; BURZYŃSKI, M. Different effect of cadmium and copper on H⁺-ATPase activity in plasma membrane vesicles from *Cucumis sativus* roots. **Journal of experimental botany**, [s.l.] v. 63, n. 11, p. 4133-4142, 2012.
- JUSTESEN, B.; HANSEN R. W.; MARTENS, H. J.; THEORIN L.; PALMGREN, M. G.; MARTINEZ K. L.; POMORSKI, T. G.; FUGLSANG A. T. Active plasma membrane P-type H⁺-ATPase reconstituted into nanodiscs is a monomer. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], p. jbc. M112. 446948. 2013.
- 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**, [s.l.], v. 14, n. 4, p. R36, 2013.
- KIM, H. S.; OH, J. M.; LUAN, S.; CARLSON, J. E.; AHN, S. J. Cold stress causes rapid but differential changes in properties of plasma membrane H⁺-ATPase of camelina and rapeseed. **Journal of plant physiology**, [s.l.], v. 170, n. 9, p. 828-837, 2013.
- KÜHLBRANDT, W. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. **Nature reviews Molecular cell biology**, [s.l.], v. 5, n. 4, p. 282, 2004.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, [s.l.], v. 33, p. 1870-1874, 2016.
- LANG, V.; PERTL-OBERMEYER, H.; SAFIARIAN, M. J.; OBERMEYER, G. Pump up the volume-a central role for the plasma membrane H⁺ pump in pollen germination and tube growth. **Protoplasma**, [s.l.], v. 251, n. 3, p. 477-488, 2014.
- LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature methods**, [s.l.], v. 9, n. 4, p. 357, 2012.
- LEFEBVRE, B.; ARANGO, M.; OUFATTOLE, M.; CROUZET, J.; PURNELLE, B.; BOUTRY, M. Identification of a *Nicotianaplumbaginifolia* plasma membrane H⁺-ATPase gene expressed in the pollen tube. **Plant molecular biology**, [s.l.], v. 58, n. 6, p. 775-787, 2005.
- LESCOT, M. ; DÉHAIS P. ; THIJS, G.; MARCHAL, K.; MOREAU, Y.; VAN DE PEER Y. ROUZÉ, P.; ROMBAUTS, S. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. **Nucleic acids**

research, [s.l.], v. 30, n. 1, p. 325-327, 2002.

LISCH, D. How important are transposons for plant evolution?. **Nature Reviews Genetics**, [s.l.], v. 14, n. 1, p. 49, 2013.

LIU, H.; REN, X.; ZHU, J.; WU, X.; LIANG, C. Effect of exogenous abscisic acid on morphology, growth and nutrient uptake of rice (*Oryza sativa*) roots under simulated acid rain stress. **Planta**, [s.l.], p. 1-13, 2018.

LIU, Y.; LIU, H.; PAN, Q.; YANG, H.; ZHAN, J.; HUANG, W. The plasma membrane H⁺ -ATPase is related to the development of salicylic acid-induced thermotolerance in pea leaves. **Planta**, [s.l.], v. 229, p. 1087-1098, 2009.

LOS, D. A.; MIRONOV, K. S.; ALLAKHVERDIEV, S. I. Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions. **Photosynthesis research**, [s.l.], v. 116, n. 2-3, p. 489-509, 2013.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome biology**, [s.l.], v. 15, n. 12, p. 550, 2014.

MIRANDA, R.S.; MESQUITA, R.O.; COSTA, J.H.; ALVAREZ-PIZARRO, J.C.; PRISCO, J.T.; GOMES-FILHO, E. Integrative Control Between Proton Pumps and SOS1 Antiporters in Roots is Crucial for Maintaining Low Na⁺ Accumulation and Salt Tolerance in Ammonium-Supplied Sorghum bicolor. **Plant and Cell Physiology**, [s.l.], v. 58, p. 522-536, 2017.

MŁODZIŃSKA, E.; KŁOBUS, G.; CHRISTENSEN, M. D.; FUGLSANG, A. T. The plasma membrane H⁺ -ATPase *AHA2* contributes to the root architecture in response to different nitrogen supply. **Physiologia plantarum**, [s.l.], v. 154, n. 2, p. 270-282, 2015.

MORSOMME, P.; BOUTRY, M. The plant plasma membrane H⁺ -ATPase: structure, function and regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, [s.l.], v. 1465, p. 1-16, 2000.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell & Environment**, [s.l.], v.25, p. 239-250, 2002.

NAITO, K.; CHO, E.; YANG, G.; CAMPBELL, M. A.; YANO, K.; OKUMOTO, Y.; TANISAKA, T.; WESSLER, S. R. Dramatic amplification of a rice transposable element during recent domestication. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 103, n. 47, p. 17620-17625, 2006.

NARUSAKA, Y.; NAKASHIMA, K.; SHINWARI, Z. K.; SAKUMA, Y.; FURIHATA, T.; ABE, H.; NARUSAKA M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of Arabidopsis *rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 34, n. 2, p. 137-148, 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6ª edição. Porto Alegre: Artmed Editora, 2014.

OBROUCHEVA, N. V. Participation of plasma membrane H⁺ -ATPase in seed

germination. **International Journal of Cell Science and Molecular Biology**, [s.l.], v. 5, 2017.

OKUMURA, M.; INOUE, S. I.; KUWATA, K.; KINOSHITA, T. Photosynthesis activates plasma membrane H⁺-ATPase via sugar accumulation in Arabidopsis leaves. **Plant physiology**, [s.l.], v. 171, n. 1, p. 580-589, 2016.

OLFATMIRI, H.; ALEMZADEH, A.; ZAKIPOUR, Z. Up-regulation of plasma membrane H⁺-ATPase under salt stress may enable *Aeluropus littoralis* to cope with stress. **Molecular Biology Research Communications**, [s.l.], v. 3, p. 67-75, 2014.

OPITZ, N.; MARCON, C.; PASCHOLD, A.; MALIK, W. A.; LITHIO, A.; BRANDT, R.; PIEPHO H.; NETTLETON D.; HOCHHOLDINGER, F. Extensive tissue-specific transcriptomic plasticity in maize primary roots upon water deficit. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 67, n. 4, p. 1095-1107, 2015.

OUFATTOLE, M.; ARANGO, M.; BOUTRY, M. Identification and expression of three new *Nicotiana plumbaginifolia* genes which encode isoforms of a plasma-membrane H⁺-ATPase, and one of which is induced by mechanical stress. **Planta**, [s.l.], v. 210, n. 5, p. 715-722, 2000.

PALMGREN, M. G. Plant plasma membrane H⁺-ATPases: powerhouses for nutrient uptake. **Annual review of plant biology**, [s.l.], v. 52, n. 1, p. 817-845, 2001.

PALMGREN, M. G.; NISSEN, P. P-type ATPases. **Annual review of biophysics**, [s.l.], v. 40, p. 243-266, 2011.

PEDERSEN, B. P. et al. Crystal structure of the plasma membrane proton pump. **Nature**, [s.l.], v. 450, n. 7172, p. 1111, 2007.

PEREZ, C.; MICHELET, B.; FERRANT, V.; BOGAERTS, P.; BOUTRY, M. Differential expression within a three-gene subfamily encoding a plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase in *Nicotiana plumbaginifolia*. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 267, n. 2, p. 1204-1211, 1992.

PLANES, M. D.; NIÑOLES, R.; RUBIO, L.; BISSOLI, G.; BUESO, E.; GARCÍA-SÁNCHEZ, M. J.; FERNÁNDEZ, J. A. ALEJANDRO, S.; GONZALEZ-GUZMÁN, M.; HEDRICH, R.; RODRIGUEZ, P. L.; FERNÁNDEZ, J. A.; SERRANO R. A mechanism of growth inhibition by abscisic acid in germinating seeds of *Arabidopsis thaliana* based on inhibition of plasma membrane H⁺-ATPase and decreased cytosolic pH, K⁺, and anions. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 66, n. 3, p. 813-825, 2014.

PRISCO, J. T.; GOMES FILHO, E.; MIRANDA, R. de S. Physiology and biochemistry of plants growing under salt stress. n: GHEYI, H. R. *et al.* (Ed.). **Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados**. Fortaleza: INCTSal, p. 163-180. 2016.

ROBINSON, M. D.; OSHLACK, A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. **Genome biology**, [s.l.], v. 11, n. 3, p. R25, 2010.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing

phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, [s.l.], v. 4, p. 406-425, 1987.

SHABALA, S.; BOSE, J.; FUGLSANG, A. T.; POTTOSIN, I. On a quest for stress tolerance genes: membrane transporters in sensing and adapting to hostile soils. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 67, n. 4, p. 1015-1031, 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017.

THAKUR, P.; KUMAR, S.; MALIK, J. A.; BERGER, J. D.; NAYYAR, H. Cold stress effects on reproductive development in grain crops: an overview. **Environmental and Experimental Botany**, [s.l.], v. 67, n. 3, p. 429-443, 2010.

TODA, Y.; WANG, Y.; TAKAHASHI, A.; KAWAI, Y.; TADA, Y.; YAMAJI, N.; FENG, M.A.J.; ASHIKARI, M.; KINOSHITA, T. *Oryza sativa* H⁺-ATPase (OSA) is involved in the regulation of dumbbell-shaped guard cells of rice. **Plant and Cell Physiology**, [s.l.], v. 57, p. 1220-1230, 2016.

UENO, K.; KINOSHITA, T.; INOUE, S. I.; EMI, T.; SHIMAZAKI, K. I. Biochemical characterization of plasma membrane H⁺-ATPase activation in guard cell protoplasts of *Arabidopsis thaliana* in response to blue light. **Plant and cell physiology**, [s.l.], v. 46, n. 6, p. 955-963, 2005.

VITART, V.; BAXTER, I.; DOERNER, P.; HARPER, J. F. Evidence for a role in growth and salt resistance of a plasma membrane H⁺-ATPase in the root endodermis. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 27, n. 3, p. 191-201, 2001.

WALLEY, J. W.; SARTOR, R. C.; SHEN, Z.; SCHMITZ, R. J.; WU, K. J.; URICH, M. A.; NERY, J. R.; SMITH, L. G.; SCHNABLE, J. C.; ECKER, J. R.; BRIGGS, S. P. Integration of omic networks in a developmental atlas of maize. **Science**, [s.l.], v. 353, n. 6301, p. 814-818, 2016.

WDOWIKOWSKA, A.; KLOBUS, G. The plasma membrane proton pump gene family in cucumber. **Acta physiologia e plantarum**, [s.l.], v. 38, p. 135-145, 2016.

YAMAUCHI, S.; TAKEMIYA, A.; SAKAMOTO, T.; KURATA, T.; TSUTSUMI, T.; KINOSHITA, T.; SHIMAZAKI, K. The plasma membrane H⁺-ATPase AHA1 plays a major role in stomatal opening in response to blue light. **Plant physiology**, [s.l.], v. 171, n. 4, p. 2731-2743, 2016.

YU, C.; ZHANG, J.; PETERSON, T. Genome rearrangements in maize induced by alternative transposition of reversed Ac/Ds termini. **Genetics**, [s.l.], v. 188, n. 1, p. 59-67, 2011.

YU, P.; WHITE, P. J.; HOCHHOLDINGER, F.; LI, C. Phenotypic plasticity of the maize root system in response to heterogeneous nitrogen availability. **Planta**, [s.l.] v. 240, n. 4, p. 667-678, 2014.

YU, Y.; SHI, J.; LI, X.; LIU, J.; GENG, Q.; SHI, H.; KE Y.; SUN, Q. Transcriptome analysis reveals the molecular mechanisms of the defense response to gray leaf spot disease in maize. **BMC genomics**, [s.l.], v. 19, n. 1, p. 742, 2018.

ZENG, H.; DI, T.; ZHU, Y.; SUBBARAO, G. V. Transcriptional response of plasma membrane H⁺-ATPase genes to ammonium nutrition and its functional link to the release of biological nitrification inhibitors from sorghum roots. **Plant and soil**, [s.l.], v. 398, n. 1-2, p. 301-312, 2016.

ZHANG, C.; GSCHWEND, A. R.; OUYANG, Y.; LONG, M. Evolution of gene structural complexity: An alternative-splicing based model accounts for intron-containing retrogenes. **Plant physiology**, [s.l.], v. 165, n. 1, p. 412-423, 2014.

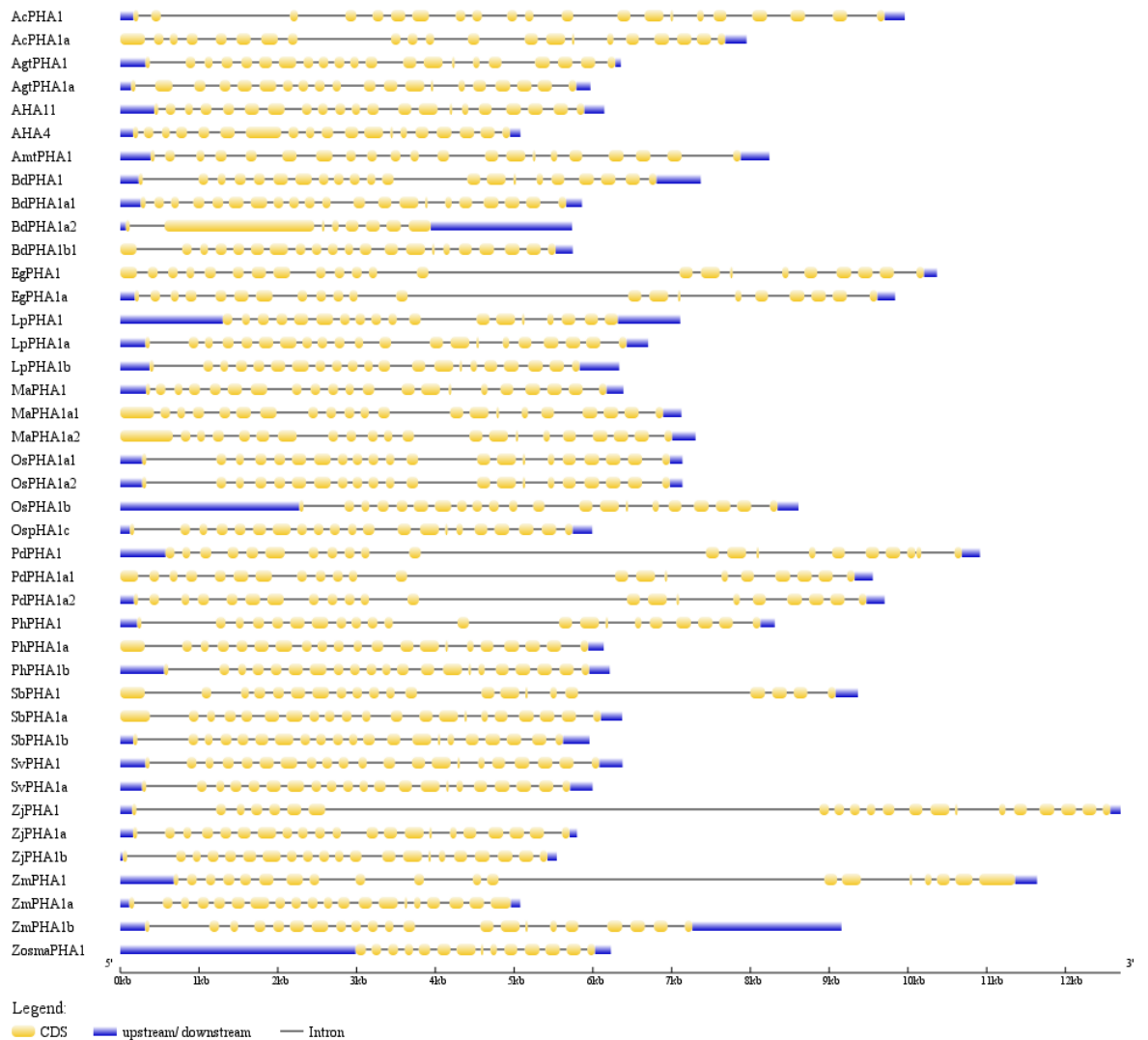
ZHANG, J. H.; LIU, Y. P.; PAN, Q. H.; ZHAN, J. C.; WANG, X. Q.; HUANG, W. D. Changes in membrane-associated H⁺-ATPase activities and amounts in young grape plants during the cross adaptation to temperature stresses. **Plant Science**, [s.l.], v. 170, n. 4, p. 768-777, 2006.

ZHANG, W.; ZHU, K.; WANG, Z.; ZHANG, H.; GU, J.; LIU, L.; YANG, J.; ZHANG, J. Brassinosteroids function in spikelet differentiation and degeneration in rice. **Journal of integrative plant biology**, [s.l.], 2018.

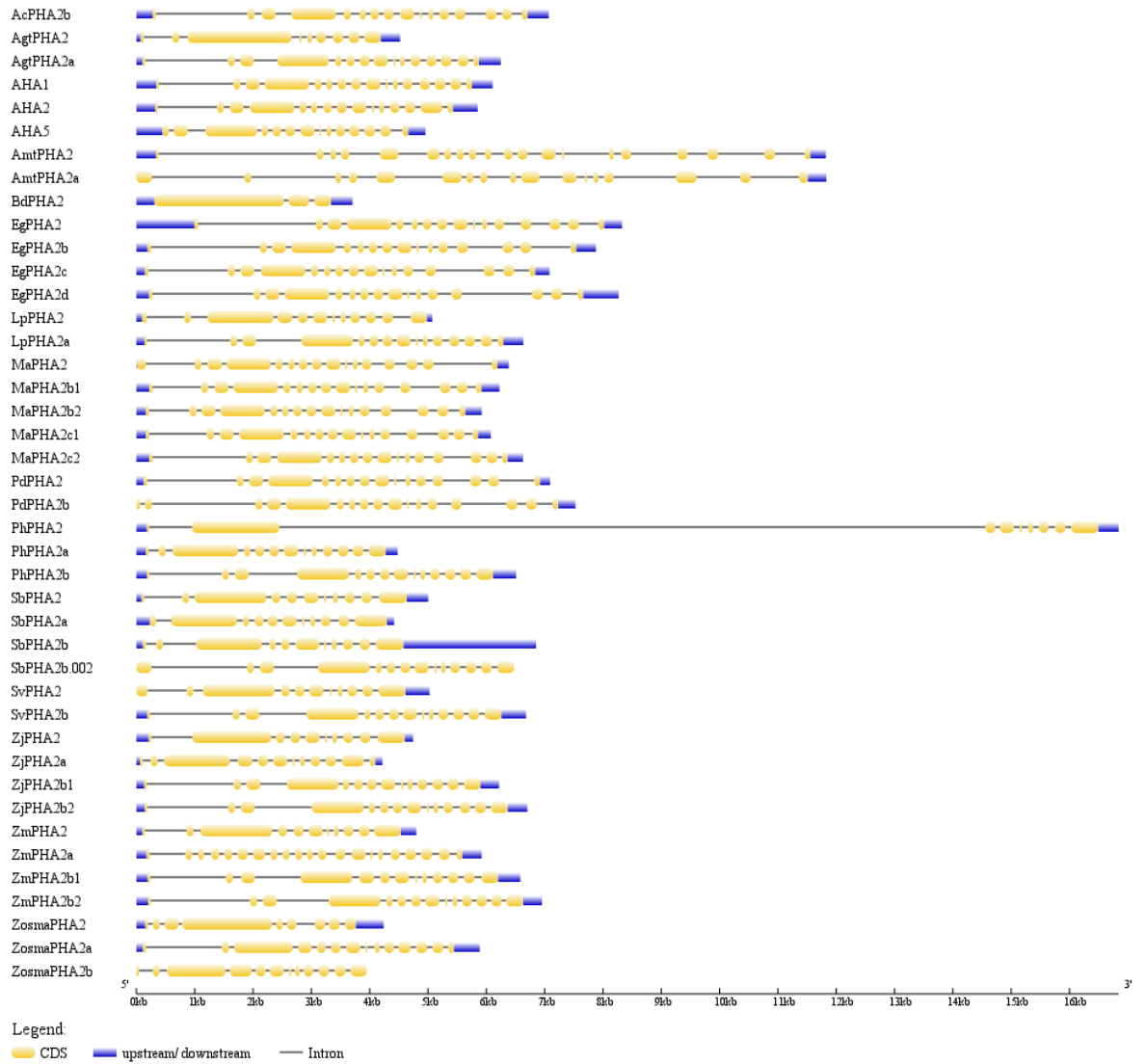
ZHAO, R.; DIELEN, V.; KINET J. M.; BOUTRY, M. Cosuppression of a plasma membrane H⁺-ATPase isoform impairs sucrose translocation, stomatal opening, plant growth, and male fertility. **The Plant Cell**, [s.l.], v. 12, n. 4, p. 535-546, 2000.

ANEXO A - CONFIGURAÇÃO ÉXON/INTRON DOS GENES DA H⁺ -ATPase DE MEMBRANA PLASMÁTICA, DE ACORDO COM OS CLADOS FORMADOS NA ÁRVORE FILOGENÉTICA. (As sequências que tiveram seu transcriptoma montado através de dados do SRA não foram incluídas na análise).

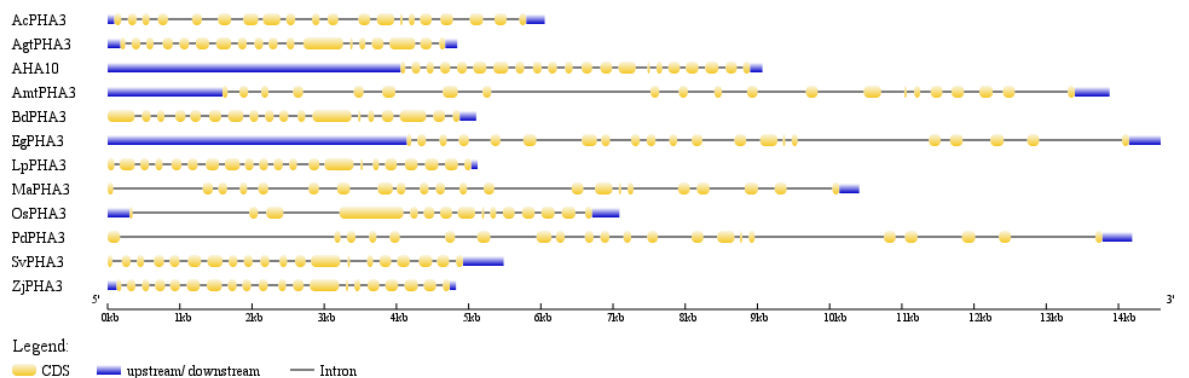
1. Clado I. (agrupou a maioria dos genes que continham 20 íntrons).



2. Clado II. (agrupou a maioria dos genes que continham de 9 a 15 íntrons).

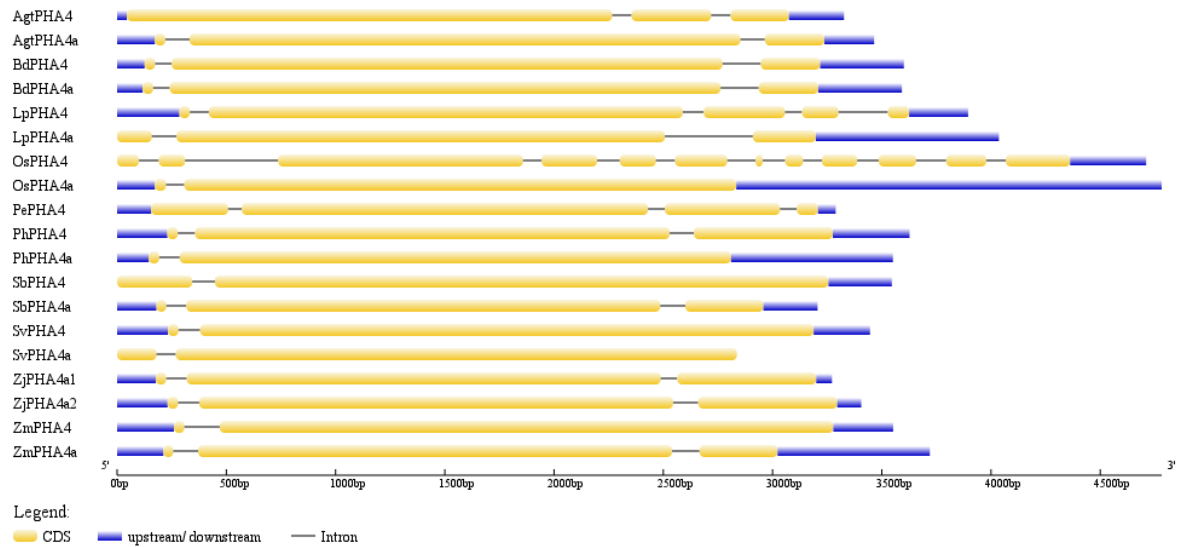


3. Clado III. (agrupou a maioria dos genes que continham de 17 a 20 íntrons).

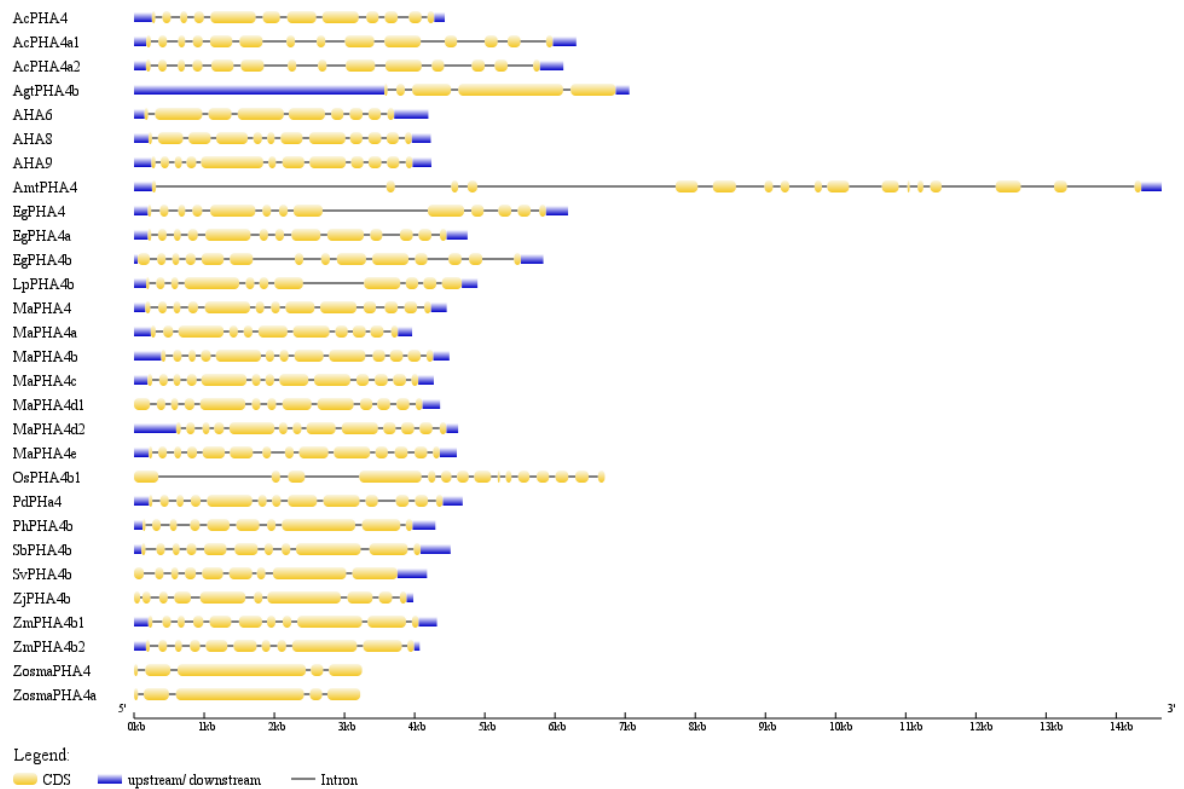


4. Clado IV

Subgrupo1 (agrupou a maioria dos genes que continham de 2 a 5 íntrons).



Subgrupo2 (agrupou os genes que continham de 8 a 14 íntrons).



5. Clado V (agrupou a maioria dos genes que continham de 17 a 20 íntrons).

