



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

GIOVANNA MAGALHÃES BASTOS SALVADOR

**ANÁLISE EVOLUCIONÁRIA DOS GENES DA OXIDASE TERMINAL DE
PLASTÍDEO (PTOX) NA SUBFAMÍLIA PANICOIDEAE**

FORTALEZA

2025

GIOVANNA MAGALHÃES BASTOS SALVADOR

ANÁLISE EVOLUCIONÁRIA DOS GENES DA OXIDASE TERMINAL DE PLASTÍDEO
(PTOX) NA SUBFAMÍLIA PANIDOIDEAE

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Programa de Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial à obtenção do grau de Bacharelado em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Hélio Costa.

FORTALEZA

2025

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

S173a Salvador, Giovanna Magalhães Bastos.
Análise evolucionária dos genes da oxidase terminal de plastídeo (PTOX) na subfamília Panicoideae /
Giovanna Magalhães Bastos Salvador. – 2025.
34 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2025.
Orientação: Prof. Dr. José Hélio Costa.

1. Melhoramento genético. 2. Duplicação. 3. Filogenia. 4. Anotação gênica. I. Título.

CDD 661

GIOVANNA MAGALHÃES BASTOS SALVADOR

ANÁLISE EVOLUCIONÁRIA DOS GENES DA OXIDASE TERMINAL DE
PLASTÍDEO (PTOX) NA SUBFAMÍLIA PANICOIDEAE

Tese ou Dissertação apresentada ao Programa de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção de grau de Bacharelado em Biotecnologia.

Aprovada em: 17/07/2025.

BANCA EXAMINADORA

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

Dra. Thais Andrade Germano
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ma. Andresiane Sousa da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A minha mãe e minha avó.

Ao Igor, o meu amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Hélio Costa, pela excelente orientação.

Aos professores participantes da banca examinadora Dra. Thais Andrade Germano e Ma. Andresiane Sousa da Silva pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Ao Matheus, agradeço pela grande ajuda com a programação das análises.

Aos colegas de laboratório, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

À Instituição CNPq, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de pesquisa e desenvolvimento.

RESUMO

As oxidases terminais de plastídio (PTOX) são proteínas-chave na cadeia de transporte de elétrons dos cloroplastos, atuando na fotoproteção e na homeostase redox em plantas. Enquanto a PTOX1 é associada à manutenção do equilíbrio oxidativo sob estresses leves a moderados, a PTOX2 predomina em condições extremas (ex.: seca, salinidade), promovendo a senescência via produção controlada de espécies reativas de oxigênio (ROS). Essa dicotomia funcional reflete adaptações críticas para espécies predominantes de ambientes de altas temperaturas e condições climáticas adversas. Este estudo investiga a diversificação evolutiva dos genes da PTOX na subfamília Panicoideae, selecionada devido à sua dominância ecológica e agrícola, representada por culturas estratégicas como milho (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum bicolor*) e cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), e às suas adaptações únicas a ambientes de estresse hídrico e foto-oxidativo, como o metabolismo C4. Para isso, conduzimos análises filogenéticas e estruturais *in silico* da PTOX de 35 espécies representativas dessa subfamília, as quais se distribuem pelas tribos Andropogoneae, Paniceae e Paspaleae utilizando dados genômicos disponíveis no repositório do site NCBI. As sequências de cDNA codificantes da proteína PTOX foram obtidas e a fase de leitura das sequências proteicas foi verificada por meio da ferramenta de tradução do Expasy. Em seguida, realizou-se uma análise comparativa da estrutura exon/intron utilizando o *Gene Structure Display Server* (GSDS). Posteriormente, a análise filogenética foi realizada por Inferência Bayesiana com o objetivo de reconstruir as relações evolutivas dos genes da PTOX na subfamília Panicoideae. Os resultados revelaram notável conservação estrutural entre os genes, com organização gênica altamente preservada (nove éxons e oito íntrons), compatível com forte pressão seletiva funcional. As análises filogenéticas indicaram a ocorrência de um evento de duplicação gênica restrito à tribo Andropogoneae, com subsequente retenção de ambas as cópias em grande parte das espécies do grupo. Os dois genes foram identificados no mesmo cromossomo e separados por curtas distâncias genéticas, apontando para uma provável duplicação em tandem. Por outro lado, a subtribo Chrysopogoninae apresentou apenas um gene funcional, sugerindo perda secundária de PTOX2 após a duplicação ancestral.

Palavras-chave: melhoramento genético, duplicação, filogenia, anotação gênica

ABSTRACT

Plastid terminal oxidases (PTOX) are key proteins in the chloroplast electron transport chain, acting in photoprotection and redox homeostasis in plants. While PTOX1 is associated with maintaining oxidative balance under mild to moderate stresses, PTOX2 predominates under extreme conditions (e.g., drought, salinity), promoting senescence via controlled production of reactive oxygen species (ROS). This functional dichotomy reflects critical adaptations for species predominant in high-temperature environments and adverse climatic conditions. This study investigates the evolutionary diversification of genes within the Panicoideae subfamily, selected due to its ecological and agricultural dominance, represented by strategic crops such as maize (*Zea mays*), sorghum (*Sorghum bicolor*), and sugarcane (*Saccharum spp.*), and its unique adaptations to water stress and photo-oxidative environments, such as C4 metabolism. To this end, we conducted in silico phylogenetic and structural analyses of the PTOX of 35 representative species from this subfamily, distributed across the Andropogoneae, Paniceae, and Paspaleae tribes, using genomic data available in the site NCBI repository. Protein-coding cDNA sequences for PTOX were obtained, and the protein sequence's reading phase was verified using the ExPASy Translate tool. Subsequently, a comparative analysis of exon/intron structure was performed using the Gene Structure Display Server (GSDS). Phylogenetic analysis was then conducted using Bayesian Inference to reconstruct the evolutionary relationships of PTOX's genes within the Panicoideae subfamily. The results revealed remarkable structural conservation among PTOX's genes, with a highly preserved gene organization (nine exons and eight introns), compatible with strong functional selective pressure. Phylogenetic analyses indicated the occurrence of a gene duplication event restricted to the Andropogoneae tribe, with subsequent retention of both copies in most species of the group. The two genes were identified on the same chromosome and separated by short genomic distances, pointing to a probable tandem duplication. Conversely, the Chrysopogoninae subtribe exhibited only one functional gene, suggesting secondary loss of PTOX2 after the ancestral duplication.

Keywords: genetic improvement, duplication, phylogeny, gene annotation

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	JUSTIFICATIVA.....	12
2.1	Relevância Evolutiva e Funcional da Subfamília Panicoideae.....	12
2.2	Funções Bioquímicas da Oxidase Terminal de Plastídeo.....	12
2.3	Trajatória dos Estudos sobre a PTOX na Literatura Científica.....	15
3	OBJETIVOS.....	18
3.1	Objetivo Geral.....	18
3.2	Objetivos Específicos.....	18
4	METODOLOGIA.....	19
4.1	Identificação da PTOX na subfamília Panicoideae.....	19
4.2	Análise da Estrutura Gênica.....	20
4.3	Análise Filogenética.....	20
5	RESULTADOS.....	21
5.1	Discrepância da Composição Amostral e Verificação da Conservação das Sequências.....	21
5.2	Filogenia e Distribuição dos Genes de PTOX.....	28
6	CONCLUSÃO.....	33
	REFERÊNCIAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

A fotossíntese constitui um dos processos bioquímicos fundamentais para a sustentabilidade da vida na Terra. Essencialmente, é a via pela qual as plantas, algas e algumas bactérias convertem a energia solar em energia química, armazenada em carboidratos, que serve como base para toda a cadeia alimentar. Este complexo processo ocorre nos cloroplastos, organelas especializadas que hospedam a maquinaria intracelular responsável pela captura de luz e transformação de energia, mantendo eficientemente o desenvolvimento vegetal em condições normais.

Não obstante, as plantas, como organismos autotróficos sésseis, estão constantemente expostas a uma variedade de estresses ambientais que podem comprometer não apenas sua sobrevivência, mas também seu desenvolvimento e produtividade. Entre esses estresses, destacam-se a seca, a luminosidade intensa e a salinidade, que representam desafios significativos para a manutenção da integridade celular e dos processos fisiológicos. Em resposta a essas adversidades, as plantas desenvolveram sofisticados mecanismos de adaptação, sendo as proteínas oxidases terminais de plastídio (PTOX) uma das principais mediadoras dessa resiliência¹. Essas proteínas desempenham papéis fundamentais na cadeia de transporte de elétrons nos cloroplastos, onde não apenas dissipam excesso de energia luminosa prevenindo a formação de espécies reativas de oxigênio(ROS), mas também catalisam reações oxidativas-chave na síntese desses pigmentos fotoprotetores como os carotenóides¹, pigmentos vegetais (amarelos, laranjas e vermelhos) que protegem as plantas do excesso de luz, auxiliam na fotossíntese, atuam como antioxidantes e atraem polinizadores.

A proeminência agrônômica da subfamília Panicoideae (Poacea), cujas espécies se distribuem em 212 gêneros e aproximadamente 3.316 espécies² em biomas tão contrastantes quanto o Cerrado brasileiro e as savanas africanas e sustentam cultivos globais desde solos áridos a áreas inundáveis, oferece um contexto único para explorar essa resiliência mediada por PTOX. Milho (*Zea mays*), cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) e sorgo (*Sorghum bicolor*), por exemplo, são amplamente utilizadas em sistemas agrícolas sob diferentes regimes climáticos resultou na acumulação de um vasto corpo de conhecimento sobre sua fisiologia, genética e manejo. Essa confluência entre legado agrônômico documentado e plasticidade biogeográfica, estabelece uma base experimental sólida para investigar padrões evolutivos dos genes PTOX1 e PTOX2³.

Esta confluência singular entre dimensões ecológicas e agrônômicas fundamenta o objetivo central do estudo: elucidar os mecanismos evolutivos que moldaram a diversificação dos genes PTOX1 e PTOX2 em Panicoideae. Para tal, adotou-se uma amostragem

representativa que abrange desde tribos agronomicamente importantes como Andropogonineae, com seus gêneros emblemáticos, até linhagens basais com relevância filogenética, como Paspaleae e Paniceae.

Utilizando-se de uma análise comparativa detalhada, a investigação busca decifrar padrões de conservação na arquitetura éxon/intron das PTOX na subfamília Panicoideae. Em seguida, procedeu-se à construção de uma árvore filogenética utilizando métodos de inferência robustos, com o intuito de reconstruir a história filogenética dos genes para analisar a possibilidade de duplicações gênicas durante eventos de especiação, identificar e nomear as sequências duplicadas.

Assim, abordagem integrativa, aliando anotação genômica, análise estrutural e filogenética, visa ampliar o entendimento mais detalhadamente sobre a evolução funcional da PTOX em monocotiledôneas e identificar seus padrões de forma a criar uma base teórica para investigações futuras sobre mecanismos moleculares de adaptação ao estresse ambiental, visando maior resiliência e sustentabilidade agrícola.

2 JUSTIFICATIVA

2.1 Relevância Evolutiva e Funcional da Subfamília Panicoideae

As Panicoideae constituem alicerces vitais dos biomas brasileiros, moldando paisagens e garantindo funções ecossistêmicas críticas. No Cerrado, espécies das tribos Paspaleae e Paniceae (como *Axonopus spp.* e *Paspalum spp.*) atuam na proteção do solo contra erosão, ciclagem de nutrientes e suporte à fauna, com 597 espécies registradas nesse bioma – muitas endêmicas. Na Caatinga, adaptações únicas de gêneros como *Setaria* e *Urochloa* permitem resistência à aridez extrema, sustentando redes tróficas mesmo durante estiagens prolongadas.

Economicamente, as Panicoideae sustentam setores-chave da economia brasileira. Cultivos de *Saccharum spp.*, *Zea mays* e *Sorghum bicolor* respondem a uma parte significativa do PIB agrícola nacional, impulsionando cadeias de biocombustíveis, alimentação e pecuária. Paralelamente, forrageiras como *Urochloa brizantha* cobrem 50 milhões de hectares de pastagens cultivadas, correspondendo a aproximadamente 30%⁴ da região cultivável total.

A importância das espécies da subfamília Panicoideae estende-se muito além das fronteiras brasileiras, consolidando-as como pilares da segurança alimentar, bioeconomia e sustentabilidade agrícola, com cultivos³ que respondem coletivamente por mais de 30% das calorias consumidas pela humanidade e sustentam cadeias produtivas de escala planetária. O milho, domesticado há cerca de 8.000 anos na Mesoamérica, tornou-se a cultura mais produzida globalmente, com 1,2 bilhão de toneladas anuais, impulsionando desde a alimentação animal até a indústria de biocombustíveis e bioquímicos³. Paralelamente, a cana-de-açúcar fornece 70% do açúcar mundial e emerge como matéria-prima estratégica para etanol celulósico⁵, enquanto isso, Estima-se que o sorgo seja utilizado como alimento básico por mais de 500 milhões de pessoas, que vivem em países em desenvolvimento, principalmente da África e da Ásia⁶.

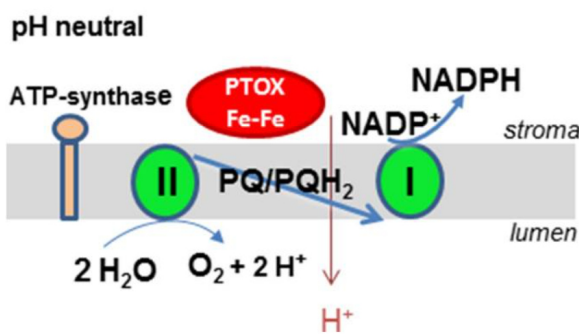
2.2 Funções Bioquímicas da Oxidase Terminal de Plastídeo

A proteína oxidase terminal de plastídeo (PTOX) é uma oxidase quinol com centro de ligação de dois átomos de ferro, que oxida plastoquinol (PQH₂) da mesma família da oxidase alternativa (AOX)⁷. A PTOX está localizada nas regiões não compactadas da membrana tilacóide e desempenha um papel essencial na fisiologia das plantas, principalmente nos cloroplastos, atuando como um regulador chave do fluxo de elétrons na cadeia de transporte

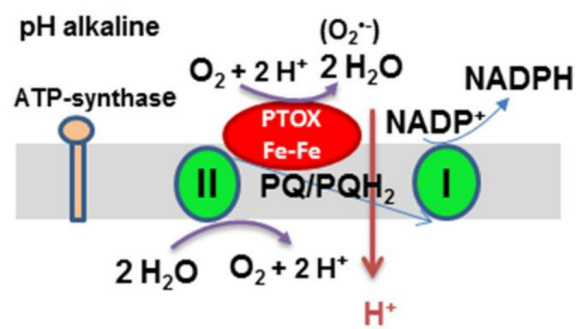
de elétrons dos cloroplastos, reduzindo O_2 a H_2O ⁹. Sua atividade permite a dissipação do excesso de energia luminosa absorvida durante a fotossíntese, evitando assim a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS)¹⁰ sob condições de estresse, como alta luminosidade, temperaturas extremas ou deficiência de nutrientes. Dessa forma, a PTOX não só atua na fotoproteção, mas também estabelece um ambiente redox estável que favorece a resposta adaptativa e a eficiência metabólica. Essa regulação influencia diretamente vias de sinalização que modulam a expressão gênica e facilitam a montagem dos complexos fotossintéticos e o desenvolvimento de plastídios, promovendo a homeostase e a adaptação das plantas a variações ambientais¹⁰.

Figura 1 - Modelo da atividade da PTOX

control conditions, non-saturating light



stress, excess light



Fonte: Krieger-Liszkay (2016)

Modelo hipotético da regulação da atividade da PTOX pelo gradiente de prótons em plantas superiores. Sob condições de luz não saturante, ocorre o transporte linear de elétrons entre o PSII e o PSI, estabelecendo-se um gradiente de prótons moderado através da membrana tilacoide. A PTOX não pode operar, pois não tem acesso ao seu substrato, o plastoquinol. Em intensidades de luz saturantes, o transporte linear de elétrons diminui, aumentando o gradiente de prótons e a concentração de plastoquinol. O estroma torna-se mais alcalino, permitindo que a PTOX se associe à membrana e catalise a oxidação do plastoquinol. A produção de $O_2^{\bullet-}$ numa reação secundária pode desencadear uma via de sinalização por ROS e, assim, uma resposta de aclimação ao estresse.

As reações fotoquímicas que ocorrem nos fotossistemas dependem dos processos fotofísicos de absorção de luz e transferência de energia dentro do complexo de captação de luz e da subsequente migração de excitação dos pigmentos de captação de luz, através dos complexos proteicos Fotossistema 2 (PSII) e Fotossistema 1 (PSI). Elétrons de PSII são transferidos e reduzem a plastoquinona (PQ) a PQH_2 , que é posteriormente oxidado pelo complexo Cyt *b6F* (Figura 1). Esta é considerada a etapa limitante da taxa no transporte

fotossintético de elétrons, porque depende da taxa de difusão de PQ/PQH₂ através da membrana tilacóide⁷.

Há consenso na literatura que a PTOX possui baixa atividade em comparação com o fluxo de elétrons fotossintético (Figura 1). O fluxo linear de elétrons fotossintéticos de PSII para PSI domina, embora vias alternativas adicionais de transporte de elétrons também possam estar envolvidas.

Sob condições de estresse ambiental, contudo, a excitação excessiva no PSII leva à super-redução do pool de PQ. Isso compromete a eficiência fotoquímica do PSII, promovendo o fotodano da proteína D1 do centro de reação do PSII e do heterodímero do centro de reação PsaA/B do PSI⁷. Como a PTOX pode competir com o fluxo de elétrons linear e cíclico e, consequentemente, reduzir a produção de NADPH, a produção de ATP e a fixação de CO₂, e potencialmente gerar ROS, sua atividade deve ser rigorosamente controlada. Somente estando ativa quando o pH estromal é alcalino (sob alta luminosidade) e a PTOX pode associar-se à membrana, obtendo acesso ao PQH₂, levando à oxidação eficiente da quinona e à redução de O₂ para H₂O. Em contraste, quando o pH estromal torna-se menos alcalino (sob condições de luz não saturante), a PTOX não pode acessar seu substrato PQH₂ e a enzima torna-se efetivamente inativa⁹.

O estado redox relativo da PQ dentro do transporte fotossintético de elétrons (PET) atua como um sensor de mudança ambiental, desencadeando um conjunto de respostas devido à integração celular em várias escalas de tempo. A modulação de curto prazo (segundos a minutos) do estado redox do PET demonstrou ativar a extinção não fotoquímica do excesso de energia através do ciclo da xantofila bem como alterações na distribuição de excitação entre fotossistemas através de transições de estado. Em uma escala de tempo mais longa (minutos a horas), a modulação do estado redox do PET demonstrou induzir alterações na expressão gênica organelar e expressão gênica nuclear através de regulação retrógrada que alteram a estrutura física do aparelho fotossintético⁹. Em uma escala de tempo de semanas a meses, as mudanças no estado redox do PET demonstraram afetar o hábito e a morfologia do crescimento das plantas, ocasionando alterações como as documentadas em espécimes mutantes de PTOX, como a *Arabidopsis*^{10,11}.

Os genes de PTOX1 e PTOX2, embora compartilhem alta similaridade sequencial (~85% de identidade em *Glycine max*), apresentam diferenças estruturais críticas que modulam sua funcionalidade. Estudos em soja revelam que variações em motivos conservados, como o sítio di-ferro e na região transmembrana, impactam a afinidade pelo substrato e a eficiência catalítica¹. Em condições padrão ou de estresse leve, , facilitando a

dissipação controlada de elétrons e a manutenção da homeostase redox¹. Sob estresse severo, PTOX2 é preferencialmente ativada, conforme evidenciado pelo aumento de 3 a 5 vezes em seus transcritos em folhas de soja sob déficit hídrico. Nessas circunstâncias, as substituições de aminoácidos no sítio ativo diminuem sua afinidade pelo substrato, resultando em atividade enzimática menos eficiente, o que pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e, consequentemente, contribuir para processos associados à senescência¹.

Essa arquitetura funcional bipartida, com PTOX1 sustentando processos basais e PTOX2 mediando respostas a desequilíbrios críticos, reflete uma solução evolutiva para otimizar custos energéticos e flexibilidade adaptativa. Em ambientes previsíveis, a regulação fina de PTOX1 maximiza a eficiência fotossintética com mínimo dispêndio metabólico. Contudo, em habitats sujeitos a perturbações abruptas, a retenção de PTOX2 confere resiliência ao atuar sacrificando eficiência imediata para prevenir colapsos sistêmicos.

2.3 Trajetória dos Estudos sobre a PTOX na Literatura Científica

Historicamente, os estudos sobre as oxidases terminais de plastídeo (PTOX) concentraram-se predominantemente em espécies-modelo de dicotiledôneas, especialmente *Arabidopsis thaliana* e *Solanum lycopersicum*, devido aos recursos genéticos consolidados e à facilidade de manipulação genética. O trabalho pioneiro de Carol et al. (1999)¹¹ caracterizou a função da PTOX em *Arabidopsis*, identificando seu papel essencial na proteção contra estresse foto-oxidativo e na regulação do desenvolvimento dos cloroplastos. Posteriormente, Shahbazi et al. (2007)¹² exploraram a PTOX em tomateiro, demonstrando sua atuação na biossíntese de carotenoides e prevenção de danos oxidativos durante a maturação de frutos. Mais recentemente, Maia et al. (2019)¹ investigaram a expressão diferencial de genes PTOX duplicados em *Glycine max* (soja), uma importante eudicotiledônea, revelando padrões específicos de expressão relacionados ao desenvolvimento da planta e a condições de estresse. Embora fundamentais essas investigações tenham o foco restrito a dicotiledôneas, forneceram as bases fundamentais para compreender as funções bioquímicas e fisiológicas dessa enzima.

Posteriormente a pesquisa sobre PTOX também passou a incluir monocotiledôneas, ainda que de maneira pontual e restrita. Estudos recentes investigaram aspectos relacionados à expressão diferencial da PTOX em gramíneas C4, como evidenciado no trabalho de Essemine et al. (2023)¹³, que analisaram a expressão de múltiplos genes PTOX em duas espécies C4 em condição de estresse salino. Tais investigações, embora promissoras, mantêm-se centradas em poucas espécies economicamente importantes, não abordando a diversidade funcional e evolutiva presente no grupo.

Essa trajetória de investigação, inicialmente concentrada em eudicotiledôneas e posteriormente estendida, de forma ainda limitada, a algumas monocotiledôneas de interesse econômico, reflete não apenas escolhas baseadas na importância agrícola das espécies, mas também restrições impostas pelas ferramentas disponíveis à época. Com o avanço contínuo das tecnologias bioinformáticas, ampliam-se progressivamente as oportunidades para investigar espécies não-modelo em escala comparativa.

Embora estudos recentes¹³ já operem nesse contexto tecnológico avançado, a elevada similaridade sequencial entre os genes PTOX1 e PTOX2, frequentemente superior a 95%¹, representou um desafio metodológico persistente, anteriormente resultando na interpretação equivocada de eventos de duplicação gênica como artefatos de anotação¹⁴.

Diante desse cenário, esta pesquisa é impulsionada pela convergência independente de avanços metodológicos e descobertas empíricas. Por um lado, observa-se o refinamento de técnicas filogenéticas de alta resolução, como a Inferência Bayesiana, que viabiliza a distinção confiável entre os genes PTOX1 e PTOX2 apesar de sua alta similaridade, permitindo detectar eventos genômicos sutis antes intratáveis. Por outro, acumulam-se evidências de padrões evolutivos contrastantes em gramíneas fundamentais: estudos consolidados no arroz (*Oryza sativa*) demonstraram a presença de apenas um gene PTOX funcional (PTOX1) e um pseudogene truncado de PTOX2¹⁵, incapaz de gerar proteína estável, enquanto investigações recentes e em *Zea mays* confirmaram a funcionalidade e expressão diferencial de ambas os genes PTOX1 e PTOX2, com papel direto na biossíntese de carotenoides em grãos¹⁶.

Essa dicotomia entre a perda funcional progressiva de PTOX2 no arroz e a retenção funcional dupla no milho sinaliza uma dinâmica evolutiva complexa nas Poaceae, sugerindo que a perda ou manutenção de genes pode estar intrinsecamente ligada a pressões adaptativas locais. A elucidação dos fatores que modulam esses destinos divergentes exige, portanto, uma abordagem comparativa em um sistema biologicamente rico e diversificado.

Para elucidar esses mecanismos, a presente pesquisa adota uma estratégia holística inédita, centrando-se na subfamília Panicoideae como microcosmo evolutivo ideal, não apenas pela sua diversidade taxonômica, mas também pela ampla variação nos padrões de distribuição geográfica, metabolismo fotossintético (incluindo a predominância de espécies C4) e importância socioeconômica.

Esta confluência singular entre dimensões ecológicas e agronômicas fundamenta o perfil amostral do presente estudo. No total foram analisadas 35 espécies cujo genoma estava disponível publicamente no banco de dados do *National Center of Biotechnology Information*

(NCBI)¹⁷, dentre elas, 19 pertencem à tribo Andropogoneae, a qual inclui gêneros de importância agrônômica como *Zea spp.*, *Saccharum spp.* e *Sorghum spp.*; 10 espécies representam a tribo Paniceae, notável por sua diversidade morfológica e ocupação de variados nichos ecológicos; 3 espécies da tribo Paspaleae, bem como 3 representantes de grupos externos filogeneticamente informativos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar a distribuição dos genes da proteína plastídeo terminal oxidase (PTOX) na subfamília Panicoideae.

3.2 Objetivos Específicos

- Anotar manualmente os genes PTOX em genomas da subfamília Panicoideae disponíveis no site NCBI¹⁷;
- Deduzir e validar cDNAs e proteínas via bancos de dados e a ferramenta do Expasy Translate¹⁸;
- Fazer a análise comparativa da estrutura gênica dos genes usando o *Gene Structure Display Server* (GSDS)¹⁹;
- Construir de árvores filogenéticas (MrBayes)²⁰ para identificação dos genes PTOX da subfamília Panicoideae.

4 METODOLOGIA

4.1 Identificação da PTOX na subfamília Panicoideae

A anotação das sequências da PTOX foi feita a partir de sequências genômicas disponíveis nos repositórios do NCBI, selecionadas e organizadas anteriormente mediante uma pesquisa simples no próprio site. Utilizando a PTOX de *Zea mays* como referência, foram analisados registros genômicos do banco de dados RefSeq, contigs do Whole Genome Shotgun (WGS) ou, de forma mais limitada, do Sequence Read Archive (SRA) das espécies em estudo, de acordo com a disponibilidade.

Para a anotação do cDNA, usou-se o blastn (Nucleotide BLAST) com as sequências obtidas anteriormente, no modo Discontiguous Megablast (*More dissimilar sequences*), configurado com tamanho de palavra (*Word size*) = 11, escores *Match/Mismatch* = 1/-3, custos de *Gap* (abertura = 5, extensão = 2) e máximo de 100 sequências alvo. As buscas priorizaram o banco RefSeq RNA específico da espécie quando disponível; na sua ausência, utilizou-se o RefSeq RNA de táxons filogeneticamente próximos, utilizando, nesse caso os parâmetros Somewhat Similar Sequences e word size reduzido para 7, devido à tendência dessa proteína em apresentar alguns segmentos exônicos de curta extensão, o que exige maior sensibilidade na busca.

Com o intuito de complementar a análise e de assegurar o alinhamento preciso de introns e éxons mesmo em táxons disponíveis no RefSeq RNA apresentando cobertura insuficiente ou ausência de anotações de qualidade ideal, complementou-se a análise com buscas no banco de dados Transcriptome Shotgun Assembly (TSA), recuperando transcritos validados mesmo em táxons com dados fragmentados.

Após a obtenção dos cDNAs anotados, utilizou-se a ferramenta Translate, disponível no portal Expasy (Expert Protein Analysis System), como estratégia de verificação da presença de uma única fase de leitura aberta (ORF) contínua e funcional para o CDNA da PTOX, sem interrupções prematuras ou quadros de leitura incorretos. Esta etapa foi essencial tanto para a validação da completude das sequências anotadas quanto para o reforço da confiabilidade dos alinhamentos realizados previamente. Em determinadas situações, constatou-se a necessidade de ajustes manuais, como a adição ou remoção de nucleotídeos nas extremidades das sequências, a fim de preservar a integridade da fase de leitura. Tais modificações foram presumivelmente exigidas por inconsistências oriundas de erros de montagem ou de anotação presentes em alguns registros do NCBI. Esta curadoria garantiu

que todas as sequências proteicas subsequentes representassem genes biologicamente válidos para as análises filogenéticas.

4.2 Análise da Estrutura Gênica

Com base nas sequências de cDNA validadas e suas respectivas anotações estruturais (éxons, íntrons, UTRs), realizou-se uma análise comparativa da organização estrutural dos genes PTOX utilizando o GSDS. O GSDS foi empregado para gerar representações visuais padronizadas das estruturas gênicas, permitindo a comparação direta de características como: número de éxons e íntrons, comprimentos relativos dos íntrons e posições das junções de splicing entre as diferentes espécies e genes (PTOX1 e PTOX2) da subfamília Panicoideae.

4.3 Análise Filogenética

As sequências proteicas foram alinhadas no MEGA11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) utilizando o algoritmo MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) com os parâmetros padrão (gap open = -400; gap extend = 0). A análise filogenética foi conduzida por Inferência Bayesiana no programa MrBayes v3.2.7.

Para reconstruir as relações evolutivas da proteína PTOX, adotou-se o modelo de substituição de aminoácidos WAG+G (Whelan-And-Goldman + Gamma), selecionado por sua base empírica em mais de 3.900 proteínas filogeneticamente diversas. Essa escolha permite capturar padrões de substituição em grupos taxonômicos amplos, como Poaceae, além de acomodar a heterogeneidade de taxas evolutivas entre sítios da PTOX, crucial para regiões funcionais como o domínio de ligação a quinonas.

Para implementar o modelo, foram executadas quatro cadeias de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) ao longo de 5×10^6 gerações, com amostragem a cada 1000 gerações. As primeiras 25% das árvores foram descartadas como *burn-in*, garantindo a estabilidade das estimativas.

5 RESULTADOS

5.1 Discrepância da Composição Amostral e Verificação da Conservação das Sequências

No total foram analisadas 35 espécies, de acordo com o Quadro 1.

Quadro 1 - Características moleculares dos genes de PTOX anotadas em espécies de Panicoideae.

(continua)

TRIBO	ESPÉCIE	N. GENES	ACRÔNIMO	N. NUCLEOTÍDEO	N. AMINOÁCIDO	INTERVALO GENÔMICO
Andropogoneae	<i>Imperata cylindrica</i>	2	IcPtox1	1044	347	SRX14840930
			IcPtox2	1032	343	SRX14840930
	<i>Diectomis fastigiata</i>	2	DfaPtox1	1020	339	SRX19446392
			DfaPtox2	999	332	SRX19446392
	<i>Bothriochloa decipiens</i>	4	BdPtox1a	981	326	>JALGXP0100000 15.1:2290520-2296597
			BdPtox1b	987	328	>JALGXP0100000 13.1:2688836-2694895
			BdPtox2a	1026	341	>JALGXP0100000 15.1:2286857-2292773
			BdPtox2b	1053	350	>JALGXP0100000 13.1:2685474-2689836
	<i>Eulalia monostachya</i>	2	EmoPtox1	1050	349	SRX19446363
			EmoPtox2	1035	344	SRX19446363
	<i>Sorghastrum fuscescens</i>	2	SfuPtox1	1056	351	SRX19446362
			SfuPtox2	1017	338	SRX19446362
	<i>Trachypogon chevaleri</i>	2	TchPtox1	1044	347	SRX19446358
			TchPtox2	1032	343	SRX19446358
	<i>Eulaliopsis binata</i>	2	EbiPtox1	1053	350	SRX19446354
			EbiPtox2	1032	343	SRX19446354
	<i>Dimeria aristata</i>	2	DarPtox1	1053	350	SRX19446384
			DarPtox2	1017	338	SRX19446384
	<i>Miscanthus floridulus</i>	2	MflPtox1	1047	348	>JAAIKP0100000 12.1:c80215413-80209439
			MflPtox2	1029	342	>JAAIKP0100000 12.1:c80227333-80219638

(continuação)

TRIBO	ESPÉCIE	N. GENES	ACRÔNIMO	N. NUCLEOTÍDEO	N. AMINOÁCIDO	INTERVALO GENÔMICO
Andropogoneae			SofPtox1	1047	348	>JAIWYO0100000 43.1:c67788089-67 779267
	<i>Saccharum officinarum</i>	2	SofPtox2	966	321	>JAIWYO0100000 43.1:c67827282-67 822518
			SbPtox1	1056	351	>JBEXCJ0100000 09.1:c61060663-61 054917
	<i>Sorghum bicolor</i>	2	SbPtox2	1011	336	>JBEXCJ0100000 09.1:c61066855-61 060391
			EoPtox1	981	326	>JAHLS01000000 9.1:c65762717-657 51614
	<i>Eremochloa ophiuroides</i>	2	EoPtox2	1020	339	>JAHLS01000000 9.1:c65762265-657 55087
			CaPtox1	1056	351	>RZMS01000010. 1:c126060593-126 054618
	<i>Coix aquatica</i>	2	CaPtox2	981	326	>RZMS01000010. 1:c126068464-126 061433
	<i>Chrysopogon zizanioides</i>	1	CziPtox	1035	344	SRX24798707
	<i>Chrysopogon serrulatus</i>	1	CsePtox	1038	345	>JADLZL0100069 28.1:45675-52376
	<i>Chrysopogon aucheri</i>	1	CacPtox	1035	344	SRX19446378
			UaPtox1	1038	345	SRX19446352
	<i>Urelytrum agropyroides</i>	2	UaPtox2	1041	346	SRX19446352
			ArlPtox1	963	320	SRX19446371
	<i>Arthraxon lancifolius</i>	2	ArlPtox2	954	317	SRX19446371
Paspaleae			ZmPtox1	1026	341	>NC_050097.1:304 0273-3047004
	<i>Zea mays</i>	2	ZmPtox2	1020	339	>NC_050097.1:297 0360-2977523
Paspaleae	<i>Paspalum notatum</i>	1	PnPtox	981	326	>JAJQMO0100000 07.1:c47246960-47 240097
	<i>Paspalum vaginatum</i>	1	PvPtox	978	325	>JAPDNB0100002 18.1:c750549-7447 62
Paniceae	<i>Cenchrus americanus</i>	1	CamPtox	978	325	>JAMZRY010000 003.1:2474000-248 0000
	<i>Setaria italica</i>	1	SitPtox	966	321	>JAMZRY010000 003.1:2474000-248 0000

(conclusão)

TRIBO	ESPÉCIE	N. GENES	ACRÔNIMO	N. NUCLEOTÍDEO	N. AMINOÁCIDO	INTERVALO GENÔMICO
Paniceae	<i>Setaria viridis</i>	1	SviPtox	969	322	>NC_048265.1:c2052702-2046877
	<i>Urochloa ruziziensis</i>	1	UrPtox	1020	339	>WEIB01000006.1:49840000-49846000
	<i>Panicum hallii</i>	1	PhaPtox	1041	346	>NC_038048.1:c46722000-46716000
	<i>Panicum virgatum</i>	1	PvirPtox	1035	344	>NC_053151.1:c49087609-49081425
	<i>Panicum miliaceum</i>	1	PmiPtox	1038	345	>JAVRNH010000015.1:c32752670-32746417
	<i>Alloteropsis semialata</i>	1	AsePtox	1041	346	>QPGU01000082.1:c64237481-64231404
	<i>Digitaria radicata</i>	1	DraPtox	1038	345	>JBCJKR010000007.1:c42327990-42320086
	<i>Dichanthelium oligosanthes</i>	1	DolPtox	1041	346	>LWDX02015725.1:1-4000
Outgroup	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1	AtPtox	1056	351	>NC_003075.7:c11774555-11767797
	<i>Solanum lycopersicum</i>	1	SlPtox	1101	366	>NC_090810.1:c5583867-5574816
	<i>Oryza sativa</i>	1	OsPtox	1011	336	>NC_089038.1:c34647931-34641091

Fonte: Elaboração própria

Nota: TRIBO: Classificação taxonômica tribal; ESPÉCIE: Nome científico com autoridade omitida; N. GENES: Número de genes identificados por genoma; ACRÔNIMO: Designação única do gene (Espécie + PTOX + Número); N. NUCLEOTÍDEOS: Comprimento da sequência codificante (bp); N. AMINOÁCIDOS: Tamanho da proteína predita (resíduos); INTERVALO GENÔMICO: Coordenadas de coleta de início e fim do gene na sequência de referência do NCBI (Formato: ACCESSION.VERSÃO:START-END).

A disponibilidade de genomas no NCBI durante o período de coleta de dados revelou disparidades entre o número de genomas disponíveis para cada tribo. Andropogoneae, por exemplo, contava com 174 genomas publicados, enquanto Paspaleae possuía apenas 4 genomas. Essa assimetria refletiu-se diretamente na composição amostral, enquanto Andropogoneae representou aproximadamente 65% dos táxons, com 19 espécies, Paspaleae contou com apenas 2 e Paniceae, com 10 como visto no Quadro 1.

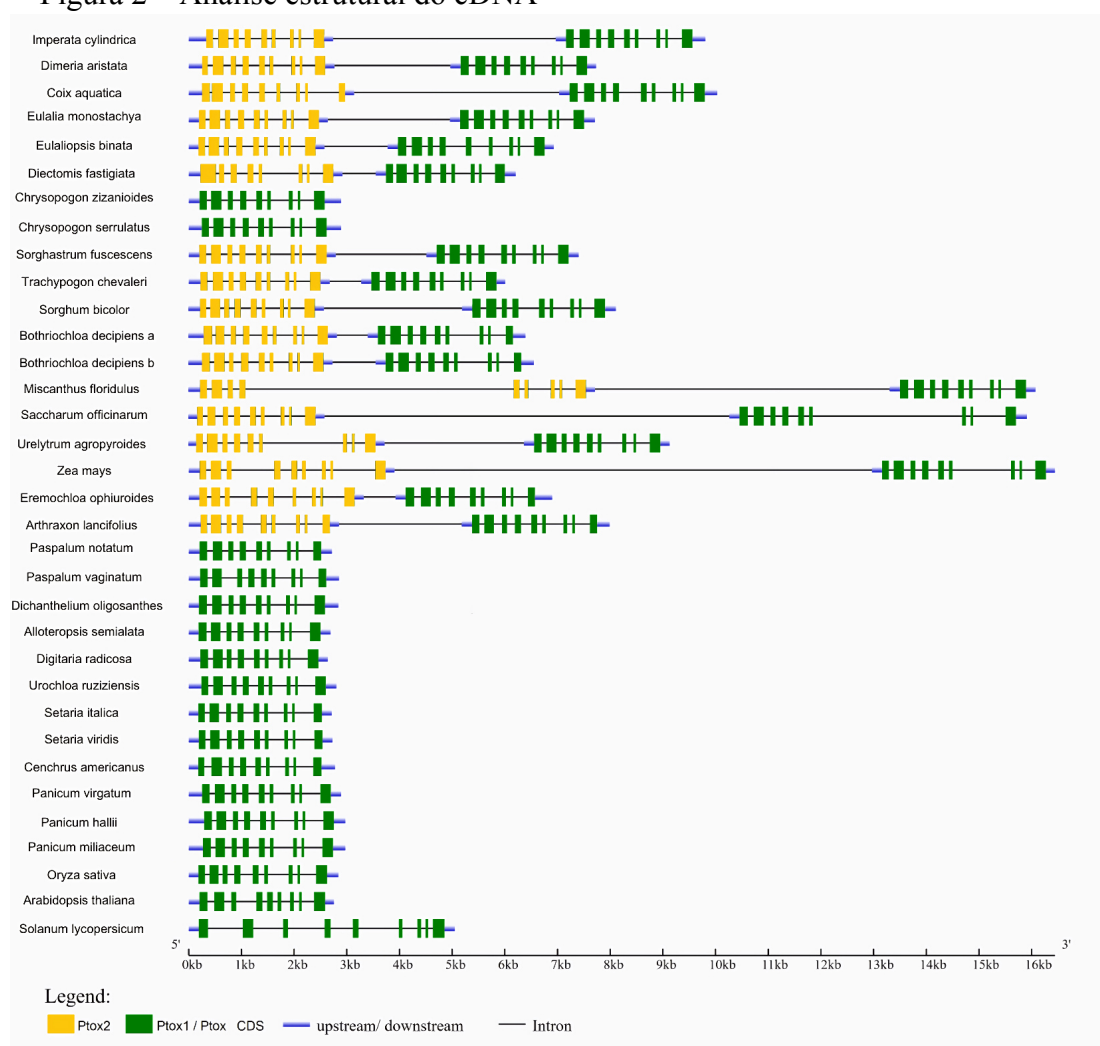
Todos os cDNAs anotados foram submetidos a algumas etapas de validação, incluindo a tradução via ferramenta ExPASy, assegurando a presença de domínios conservados e a continuidade do quadro de leitura (ORF), e a comparação entre si por alinhamentos pareados entre as sequências. Os resultados demonstraram elevada identidade

entre as sequências, com valores consistentemente superiores a 80%. Utilizando-se o cDNA do gene PTOX1 de *Zea mays* como referência de comparação, observou-se que os resultados confirmaram alta conservação evolutiva, com variação entre 84% e 94% entre tribos, corroborando a integridade funcional das anotações e a conservação relativa mesmo em táxons filogeneticamente distantes.

Embora o percentual médio de identidade observado neste estudo seja ligeiramente inferior ao relatado em pesquisas anteriores, as quais indicam valores superiores a 95%¹, essa diferença pode ser explicada pela maior abrangência taxonômica considerada nesta investigação. Ao incluir um conjunto mais diverso de espécies, com destaque para representantes de tribos menos estudadas e organismos não modelo, ampliou-se a variabilidade genética considerada, o que naturalmente resulta em uma queda discreta nos índices de identidade observados.

Não obstante, para assegurar a robustez da análise nesse quadro amostral ampliado e investigar de forma mais precisa a organização do cDNA ao longo dos estágios evolutivos, realizou-se uma verificação complementar por meio da ferramenta GSDS. Essa etapa adicional possibilitou a comparação dos padrões de distribuição de éxons e íntrons, oferecendo um critério estrutural objetivo para validar a integridade das anotações, especialmente nos casos com menor identidade aparente.

Figura 2 – Análise estrutural do cDNA



Fonte: Elaboração própria

Análise comparativa das estruturas gênicas que codificam PTOX1 e PTOX2 em espécies selecionadas da subfamília Panicoideae. Êxons são representados por caixas e íntrons por linhas, evidenciando semelhanças e diferenças na arquitetura gênica entre as espécies. Os genes PTOX1 e PTOX2 estão destacadas em verde e amarelo, respectivamente. Os dados genômicos foram obtidos de bancos públicos e analisados por meio da ferramenta *Gene Structure Display Server* (GSDS).

A organização genômica dos genes PTOX nas espécies analisadas (Figura 1) evidencia um padrão recorrente de colocação cromossômica, no qual ambas as cópias encontram-se alocadas no mesmo cromossomo e, em diversos casos, separadas por distâncias físicas reduzidas, variando aproximadamente entre aproximadamente 5k e 50k pares de base. Este arranjo foi observado exclusivamente entre representantes da tribo Andropogoneae, sendo esta a única tribo na qual o gene PTOX2 foi detectado.

Embora parte das sequências utilizadas tenha sido obtida a partir de dados derivados

de arquivos SRA, o que impossibilita a identificação precisa da localização cromossômica, análises complementares foram conduzidas com base em extensões genômicas adjacentes à extremidade 3' da PTOX2. Esses levantamentos revelaram que, mesmo nas sequências reconstruídas por SRA, a maioria das espécies manteve a proximidade entre os genes, com intervalo médio de aproximadamente 5k pares de bases. A consistência desse padrão entre os membros da Andropogoneae reforça a hipótese de que a duplicação em tandem tenha ocorrido no ancestral comum da tribo, estabelecendo a base estrutural para os eventos de especialização gene-específico atualmente observados.

A análise da estrutura gênica, conduzida por meio da ferramenta Gene Structure Display Server (GSDS, Figura 2), revelou uma estrutura gênica padrão dos genes PTOX1 e PTOX2 entre as espécies da subfamília Panicoideae avaliadas, com nove êxons e oito íntrons presentes de forma consistente em todas as sequências analisadas. A estabilidade observada tanto no comprimento quanto na quantidade de éxons reforça a preservação estrutural desses genes e complementa as evidências de identidade obtidas por alinhamentos nucleotídicos, demonstrando a conservação funcional e evolutiva da PTOX no nível genômico.

Embora o padrão exônico permaneça inalterado, uma minoria das linhagens analisadas exibiu alongamentos intrônicos notáveis. *Saccharum officinarum* exibiu um íntron expandido de aproximadamente 2.800 pb na PTOX1, enquanto *Miscanthus floridulus* apresentou um alongamento mais extremo, de ~5.100 pb na PTOX2. *Urelytrum agropyroides*, por sua vez, registrou ~1.700 pb na PTOX2. Em contraste, *Zea mays* conserva extensões mais moderadas (~1.100 pb para PTOX1; ~800 pb para PTOX2), porém ainda alongadas em comparação ao padrão basal observado nas demais espécies, que não apresentaram alongamentos intrônicos expressivos. Tais modificações podem refletir adaptações locais em mecanismos de regulação transcricional ou plasticidade genômica associada à história evolutiva desses táxons.

Para elucidar a origem das discrepâncias intrônicas observadas, foram formuladas hipóteses embasadas em dados previamente estabelecidos relativos à conformação genômica, obtidos por estudos comparativos e filogenéticos dessas espécies. O genoma de *Saccharum officinarum* é notório por sua elevada complexidade, com um número variável de cromossomos (80 a 130) entre diferentes genótipos, sendo um dos maiores genomas entre as gramíneas²². Além de ser integrante de um clado com alta instabilidade cromossômica decorrente de múltiplos eventos de poliploidização e rediploidização, o último evento comum a *Miscanthus spp.* e *Saccharum spp.* tendo ocorrido há aproximadamente cinco milhões de anos^{22,23}, ligeiramente antes da especiação de seu ancestral comum. Essa complexidade

genômica única de *Saccharum officinarum* cria um ambiente permissivo que pode ter facilitado a incorporação de grandes blocos de elementos transponíveis (TEs) em regiões intrônicas, promovendo expansões de considerável magnitude, justificando o distinto alongamento do intron da PTOX1 (Figura 2) dessa espécie.

Embora compartilhem um ancestral comum recente, as pressões e eventos genômicos que moldaram cada linhagem se diferenciam substancialmente. Duas rodadas de duplicação do genoma completo (WGD) ocorreram nos últimos 4 milhões de anos e presumivelmente deram origem aos cromossomos básicos característicos da *Saccharum officinarum* moderna²³. Em contraste, o ancestral do *Miscanthus* provavelmente passou por um evento de autopoliploidização logo após sua divergência do ancestral do *Saccharum* seguido por um de rediploidização, contribuindo para a evolução posterior em direção às formas atuais do genoma do *Miscanthus*²³. Sustentando, assim, a hipótese que as fusões cromossômicas e a compactação genômica decorrentes da rediploidização teriam estabelecido um contexto estrutural distinto, canalizando a inserção de TEs para *loci* alternativos, como evidenciado na expansão do intron da PTOX2 em *M. floridulus*.

Assim como *Miscanthus*, o *Zea mays*, embora atualmente classificado como diploide, apresenta uma história genômica marcada por eventos de paleopoliploidia. Seu genoma distingue-se por uma elevada densidade de elementos transponíveis (TEs), que correspondem a aproximadamente 85% de seu tamanho total. Embora trabalhos iniciais não tenham identificado o padrão de distribuição dos TEs, deixando subentendida uma distribuição mais uniforme e, conseqüentemente mais frequente nas regiões ORF²⁴, investigações subsequentes demonstram sua predominância intergênica, com apenas cerca de 10% dos genes codificadores contendo inserções intrônicas de TEs²⁵.

Dentre os TEs mais frequentemente associados a regiões intrônicas estão os Helitrons e os retrotransposons não-LTR, cujas inserções sobrepõem-se a transcritos gênicos em 22,9% e 18,6% dos casos, respectivamente. Não obstante, tais elementos geralmente possuem comprimento superior a 1 kilobase (kb)²⁵, o que torna sua participação nos eventos de alongamento intrônico observados em *Z. mays* menos provável, uma vez que o maior intron alongado identificado em PTOX apresenta aproximadamente 1,1 kb, e os demais eventos de alongamento envolvem segmentos ainda mais curtos.

Considera-se ainda a possibilidade de envolvimento de elementos TIR (terminal inverted repeat), cuja extensão mediana é de aproximadamente 306 pares de bases, valor compatível com os introns alongados observados. Todavia, esses elementos apresentam baixa frequência de sobreposição com regiões transcritas, estando presentes em apenas 1,7% dos

casos analisados, o que reduz a probabilidade de sua contribuição direta nesses eventos específicos²⁵.

Sob essa perspectiva, a ocorrência de múltiplos eventos de alongamento observados com extensões limitadas reforça a hipótese de um mecanismo alternativo ou multifatorial. Consequentemente, embora a inserção de TEs não possa ser completamente descartada como um dos fatores determinantes, sua contribuição direta para os padrões intrônicos em *Zea mays* parece ser menos significativa do que nas espécies *Saccharum officinarum* e *Miscanthus floridulus*. Assim, outras hipóteses, como a presença de microssatélites, duplicações internas, recombinação não alélica ou ações seletivas voltadas à regulação transcricional e funcional específica da PTOX1 e PTOX2, devem ser consideradas como possíveis mecanismos subjacentes às modificações observadas. Esses mecanismos apresentam compatibilidade estrutural superior com o perfil multifragmentado e de reduzida magnitude característico dos genes de PTOX nesta espécie^{24,25}.

Embora estudos genômicos específicos para *Urelytrum agropyroides* permaneçam escassos na literatura, impedindo uma análise mais detalhada da origem do alongamento observado em seu intron de PTOX2, o padrão de alongamento intrônico observado assemelha-se significativamente ao documentado em *S. officinarum* e *M. floridulus* caracterizando-se como um evento único de magnitude elevada (>1 kb). Esta configuração contrasta explicitamente com o perfil multifragmentado verificado em *Zea mays* e reproduz fielmente as assinaturas dimensionais típicas de inserções de elementos transponíveis de grande porte.

Em síntese, a análise estrutural validou a qualidade das anotações genômicas prévias ao confirmar a conservação estrita do arcabouço gênico básico de nove éxons e oito íntrons com extensões exônicas estáveis em todas as espécies de Panicoideae investigadas. Os eventos pontuais de expansão intrônica, restritos a linhagens específicas representam inserções genômicas recentes e não fixadas evolutivamente, como evidenciado por sua ocorrência esporádica e ausência em grupos irmãos. Essas variações, embora biologicamente reveladoras no contexto da plasticidade genômica, não constituem mutações constitutivas herdadas verticalmente, sendo mais consistentemente interpretadas como artefatos de atividade recente de elementos transponíveis ou outros mecanismos de expansão localizada.

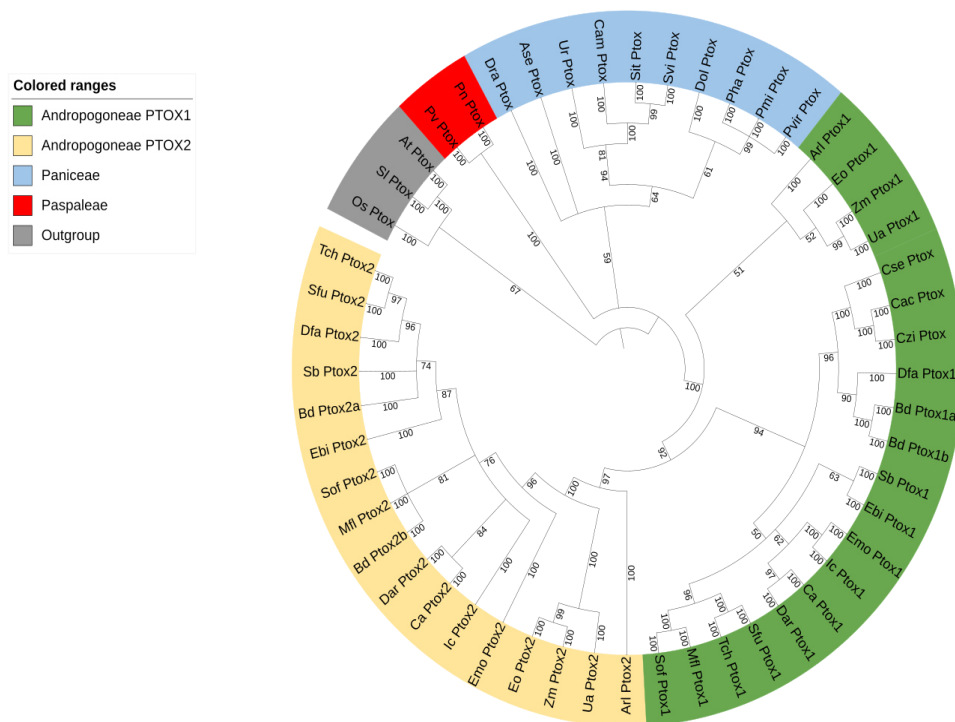
Consequentemente, tais alongamentos não comprometem as inferências primárias deste estudo, fundamentadas na conservação global da estrutura gênica e relações filogenéticas, mas sim abrem perspectivas investigativas complementares. A caracterização funcional dessas variações em suas espécies-alvo poderá elucidar potenciais impactos na

regulação transcricional, processamento de RNA ou modularidade funcional das PTOX, particularmente em contextos ecofisiológicos específicos.

5.2 Filogenia e Distribuição dos Genes de PTOX

A filogenia da PTOX na subfamília Panicoideae foi reconstituída por análise filogenética bayesiana das sequências de PTOX, mediante o modelo WAG+G. Esta reconstrução fornece o arcabouço necessário para investigar os padrões de distribuição dos genes PTOX1 e PTOX2 entre as principais linhagens desta subfamília, identificando eventos de duplicação gênica e estabelecendo relações ortólogas críticas entre homólogos em linhagens taxonomicamente distantes. A configuração filogenética obtida permite ainda investigar potenciais associações entre história evolutiva e partição funcional dos genes PTOX1 e PTOX2 ao longo da radiação das Panicoideae.

Figura 3 – Árvore Filogenética da PTOX na subfamília Panicoideae



Fonte: Elaboração própria

Relações filogenéticas da proteína PTOX em espécies da subfamília Panicoideae, inferidas por análise bayesiana com base em sequências de aminoácidos. As PTOX1 e PTOX2 de espécies da tribo Andropogoneae estão representadas pelas cores verde e amarelo, respectivamente. Espécies da tribo Paniceae são destacadas em azul, enquanto as da tribo Paspaleae aparecem em vermelho. Espécies do grupo externo (outgroup) estão indicadas em cinza. A coloração reflete tanto a identidade da PTOX quanto a organização taxonômica das espécies, evidenciando padrões de diversificação e possíveis

origens paralelas entre os grupos.

A árvore filogenética obtida (Figura 3) revelou uma divisão clara entre as sequências PTOX1 e PTOX2 (com bootstrap de 92%), bem como uma separação consistente entre as tribos analisadas (bootstrap de 100%). Notadamente, as sequências da PTOX2 foram encontradas exclusivamente em representantes da tribo Andropogoneae, o que sugere a possibilidade de uma duplicação gênica específica neste grupo. Em paralelo, as PTOX1 apresentaram distribuição mais ampla, abrangendo todas as tribos analisadas, evidenciando seu caráter mais conservado e possivelmente ancestral.

A estrutura da árvore também indicou agrupamentos coerentes com as subtribos taxonômicas reconhecidas, embora a estabilidade filogenética entre esses agrupamentos tenha se mostrado limitada em alguns ramos. Esta ambiguidade topológica era esperada, considerando a alta conservação evolutiva da proteína PTOX entre táxons próximos. Ainda que, neste estudo, a conservação global observada entre as sequências tenha sido ligeiramente inferior à relatada em trabalhos anteriores, com identidades superiores a 80%, em comparação aos mais de 95%¹ tradicionalmente reportados, essa diferença decorre da maior abrangência amostral adotada aqui, que contempla clados mais divergentes entre si. Importante ressaltar que, no contexto subtribal, os níveis de conservação da PTOX permanecem em consonância com os estudos de referência.

Embora a instabilidade nas relações inter-subtribos não comprometa as inferências centrais deste trabalho, cujo foco reside na distribuição macroevolutiva dos genes entre tribos, esta limitação topológica oferece insights relevantes para investigações futuras. A ambiguidade observada reflete desafios inerentes ao uso de marcadores altamente conservados para relações filogenéticas recentes, situação em que o sinal filogenético pode ser insuficiente para resolver radiações rápidas. Estudos subsequentes visando reconstruir relações intra-subtribais com maior resolução poderiam considerar a combinação com marcadores nucleares complementares, abordagens genômicas integrativas, ou análise de rearranjos estruturais no locus gênico da PTOX.

Aprofundando a análise da topologia previamente descrita, revelou-se uma organização topológica marcada por padrões estruturais fundamentais. Observou-se um agrupamento tribal robusto, com cada tribo formando clados monofiléticos de suporte estatístico máximo. Assim como notável coesão genômica entre PTOX1 e PTOX2, as quais, embora segregadas em subclados filogeneticamente adjacentes, se agruparam de forma mais próxima entre si do que em relação a quaisquer sequências de outras tribos, indicando sua

origem compartilhada e duplicação recente.

Esta configuração demonstra que os dois genes de Andropogoneae compartilham ancestralidade exclusiva, formando um clado coeso que se distingue claramente das sequências de PTOX1 encontradas em Paniceae e Paspaleae. Tal arranjo sustenta a hipótese de que a duplicação gênica originando PTOX2, seguida por retenção diferencial dos genes, ocorreu no ancestral imediato de Andropogoneae. A proximidade filogenética observada sugere especialização gene-específica em Andropogoneae, semelhante a diferenciação funcional evidenciada em *Glycine max*¹. Embora não se possa inferir identidade funcional entre os casos, é mais provável que as espécies de Andropogoneae estudadas exibam um padrão análogo à sub funcionalização fraca e redundância funcional documentadas no próprio *Zea mays*, onde ambas as cópias mantêm funções sobrepostas com assimetrias quantitativas¹⁶. Apesar da diferenciação sutil, é plausível que o processo evolutivo da PTOX em Andropogoneae siga trajetória convergente com a especialização observada em *Glycine max*, sugerindo um paradigma recorrente de diversificação funcional pós-duplicação em proteínas plastidiais. Contudo, esta inferência não é conclusiva devido à amostragem limitada de espécies e à distância evolutiva entre os táxons analisados e requer análises futuras.

Notavelmente, a plasticidade desse sistema é evidenciada por trajetórias evolutivas divergentes. Esta variação manifesta-se de forma particular na subtribo Chrysopogoninae, onde todos os representantes analisados conservaram apenas um gene de PTOX, contrastando com a duplicação característica de subtribos próximas. Significativamente, este gene exibiu afinidade filogenética predominante com as PTOX1 das Andropogoneae. Tal padrão sugere que Chrysopogoninae compartilhou a duplicação gênica ancestral que originou PTOX2 no grupo, mas diferentemente de outras subtribos, sofreu perda genética secundária. Tal evento pode ter ocorrido por meio de deleção, pseudogenização ou simplesmente por relaxamento seletivo, fenômenos amplamente reconhecidos em contextos de duplicações gênicas. Este evento de perda secundária não constitui um caso isolado, ecoando o processo de pseudogenização progressiva da PTOX2 em *Oryza sativa*, cujo genoma preserva vestígios não-funcionais da sequência¹⁵.

No contexto específico de Andropogoneae, a redundância funcional e subfuncionalização incipiente entre as proteínas provavelmente facilitou a perda secundária de PTOX2 nesta subtribo, devido a redução da pressão seletiva para retenção da duplicata, favorecendo eventos de perda quando o custo de manutenção do gene supera seu benefício funcional²⁶. Assim, no caso de Chrysopogoninae, é plausível que o segundo gene tenha sido dispensado precocemente, antes que diferenciações funcionais mais marcantes entre as cópias

pudessem se consolidar. Este mecanismo oferece uma explicação parcimoniosa para a ausência de PTOX2 nesta linhagem.

6 CONCLUSÃO

A integração de dados estruturais, filogenéticos e genômicos, revelou padrões evolutivos marcantes nos genes da PTOX de Panicoideae. De maneira geral, observou-se estrita da arquitetura gênica das PTOX1 e PTOX2, com nove éxons e oito íntrons presentes de forma consistente em todas as sequências analisadas. Tal estabilidade estrutural corrobora o grau de conservação previamente relatado para essa família de genes e, por conseguinte, reforça sua relevância funcional ao longo da evolução de Panicoideae. Notavelmente, nas espécies que apresentaram ambos os genes PTOX1 e PTOX2, ambos estão localizados no mesmo cromossomo e mantêm uma distância genômica reduzida entre si, compatível com um cenário de duplicação gênica em tandem recente^{16,26}.

Não obstante, reconhecem-se assimetrias amostrais significativas em sequenciamento e disponibilização de dados genômicos apesar dos avanços, observou-se uma acentuada desigualdade na quantidade e na qualidade dos registros entre as espécies analisadas. Enquanto genomas de espécies-modelo como *Zea mays*, *Sorghum bicolor* e *Setaria viridis* estão amplamente representados em bancos como RefSeq e TSA, com anotações robustas e suporte experimental, diversas espécies nativas ou não-modelo, como *Diectomis fastigiata* e *Eulalia monostachya*, possuem apenas fragmentos genômicos ou transcritos não validados. Evidentemente, tal cenário compromete a detecção de padrões de duplicação ou perda gênica em linhagens basais e obscurece a compreensão de eventos de especiação em grupos amostrais mais amplos.

Apesar dessa limitação, a subsequente análise filogenética evidenciou uma divisão clara entre as tribos e as proteínas PTOX1 e PTOX2, com esta última sendo exclusiva da tribo Andropogoneae. As PTOX dessa tribo formam um clado coeso, no qual PTOX2 se apresenta como irmã de PTOX1, indicando ancestralidade comum e uma provável origem a partir de duplicação gênica no ancestral imediato do grupo, além de levantar hipóteses relevantes acerca dos mecanismos de retenção e possível diversificação funcional dessas cópias gênicas.

A retenção dos genes ao longo da diversificação de Andropogoneae implica que processos de sub funcionalização têm desempenhado papéis na preservação desses genes duplicados. Em *Zea mays*, por exemplo, estudos indicam que ambas as cópias de PTOX são funcionalmente redundantes, com indícios de uma subfuncionalização incipiente, na qual há uma leve especialização funcional da PTOX1, com maior eficiência na acumulação de β -caroteno e padrões diferenciais de expressão tecidual, porém sem perda funcional evidente

em nenhuma das proteínas¹⁶. Este padrão indica diferenciação incipiente, característica de estágios iniciais de evolução pós-duplicação, com potencial para neofuncionalização futura.

Este cenário encontra paralelo no caso documentado em *Glycine max*, onde as duas proteínas de PTOX apresentam especializações funcionais distintas¹. Embora não se possa extrapolar diretamente tal identidade funcional direta entre famílias tão distantes, a convergência de padrões filogenéticos e a conservação diferencial entre as PTOX sugerem um modelo evolutivo recorrente de duplicação gênica atuando como ponto de partida para diversificação funcional. Considerando essa evidência, é plausível propor que as Andropogoneae estudadas representem um estágio intermediário neste continuum, com especialização incipiente a ser validada por abordagens multi-ômicas, sendo necessárias análises transcriptômicas, proteômicas e funcionais para confirmar diferenças específicas.

A complexidade deste modelo evidencia-se ao se considerar o caso da subtribo Chrysopogoninae, que apresenta somente uma PTOX cuja afinidade filogenética com PTOX1 de Andropogoneae indica que essa subtribo compartilhou o evento de duplicação gênica ancestral, mas posteriormente perdeu uma de suas cópias por eliminação ou inativação funcional. Em sistemas com redundância funcional prolongada entre cópias, a perda de um dos genes pode não acarretar em prejuízos adaptativos imediatos, tornando-se evolutivamente viável. A presença ou ausência de PTOX2, portanto, deve ser compreendida não como um traço fixo e universal, mas como reflexo de trajetórias evolutivas moldadas pela interação entre estrutura genômica, redundância bioquímica e pressões seletivas locais.

Em síntese, este estudo demonstra que a evolução dos genes de PTOX em Panicoideae segue trajetórias dinâmicas e não-lineares, moldadas por duplicações em tandem recentes, retenção diferencial e perdas gênicas seletivas. Sua conservação estrutural e sua organização genômica em Andropogoneae sustentam um cenário de subfuncionalização incipiente, enquanto a ausência de PTOX2 em Chrysopogoninae revela a plasticidade adaptativa deste sistema. Coletivamente, esses padrões não apenas elucidam a história evolutiva da PTOX em gramíneas, mas também fundamentam estratégias biotecnológicas desta via em culturas-chave. Estudos futuros integrando genômica comparativa, perfilamento transcriptômico sob estresses abióticos e caracterização funcional das PTOX serão cruciais para desvendar os mecanismos seletivos subjacentes desta diversificação, em especial, o papel da PTOX na interface entre evolução molecular e adaptação ecológica em Poaceae.

REFERÊNCIAS

- 1 RACHEL A. M. et al. **Differential expression of recently duplicated PTOX genes in Glycine max during plant development and stress conditions.** Journal of Bioenergetics and Biomembranes, v. 51, n. 5, p. 355–370, 11 set. 2019.
- 2 BURKE, S. V. et al. **Evolutionary relationships in Panicoid grasses based on plastome phylogenomics (Panicoideae; Poaceae).** BMC Plant Biology, v. 16, n. 1, 18 jun. 2016.
- 3 CAMPBELL, C. **Poaceae | Plant Family | Britannica**, 2025.
- 4 FEITOSA, O. DE S. et al. **Forage Performance and Cattle Production as a Function of the Seasonality of a Brazilian Tropical Region.** Acta Scientiarum Animal Sciences, v. 44, 2022.
- 5 VERMERRIS, W. **Genetic Improvement of Bioenergy Crops.** New York, Ny: Springer New York, 2008.
- 6 QUEIROZ, V. et al. **Sorgo Para Alimentação Humana.** In: Melhoramento Genético de Sorgo. [s.l.] Embrapa, 2021. p. 458–494.
- 7 MCDONALD, A. E. et al. **Flexibility in photosynthetic electron transport: The physiological role of plastoquinol terminal oxidase (PTOX).** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, v. 1807, n. 8, p. 954–967, 1 ago. 2011.
- 8 ZHOU, Q. et al. **PTOX-dependent safety valve does not oxidize P700 during photosynthetic induction in the Arabidopsis pgr5 mutant.** Plant Physiology, v. 188, n. 2, p. 1264–1276, 18 nov. 2021.
- 9 KRIEGER-LISZKAY, A.; FEILKE, K. **The Dual Role of the Plastid Terminal Oxidase PTOX: Between a Protective and a Pro-oxidant Function.** Frontiers in Plant Science, v. 6, 5 jan. 2016.
- 10 THIERRY JOËT et al. **Involvement of a Plastid Terminal Oxidase in Plastoquinone Oxidation as Evidenced by Expression of the Arabidopsis thaliana Enzyme in Tobacco.** Elsevier, v. 277, n. 35, p. 31623–31630, 30 ago. 2002.
- 11 CAROL, P. et al. **Mutations in the Arabidopsis Gene IMMUTANS Cause a Variegated Phenotype by Inactivating a Chloroplast Terminal Oxidase Associated with Phytoene Desaturation.** The Plant Cell, v. 11, n. 1, p. 57–68, 1 jan. 1999.
- 12 SHAHBAZI, M. et al. **Dual Role of the Plastid Terminal Oxidase in Tomato.** Plant Physiology, v. 145, n. 3, p. 691–702, 14 set. 2007.
- 13 ESSEMINÉ, J. et al. **Contrasting Responses of Plastid Terminal Oxidase Activity Under Salt Stress in Two C4 Species With Different Salt Tolerance.** Frontiers in Plant Science, v. 11, p. <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2020.01009/full>, 7 jul. 2020.
- 14 SUN, X. et al. **Identification and Characterization of Two Paralogous Plastid**

Terminal Oxidase Genes in Soybean. Disponível em:

<<https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20153430695>>.

15 TAMIRU, M. et al. **The tillering phenotype of the rice plastid terminal oxidase (PTOX) loss-of-function mutant is associated with strigolactone deficiency.** *New Phytologist*, v. 202, n. 1, p. 116–131, 18 dez. 2013.

16 NIE, Y. et al. **The maize PLASTID TERMINAL OXIDASE (PTOX) locus controls the carotenoid content of kernels.** *The Plant Journal*, v. 118, n. 2, p. 457–468, 10 jan. 2024.

17 NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

18 SIB Swiss Institute of Bioinformatics. **ExPASy Translate Tool.** Disponível em: <https://web.expasy.org/translate/>

19 HU, B.; JIN, J.; GUO, A. -Y.; ZHANG, H.; LUO, J.; GAO, G. **GSDS 2.0:** an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics*, [S. l.], v. 31, n. 8, p. 1296-1297, 2015.

20 RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. **MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models.** *Bioinformatics*, Oxford, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003

21 TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. **MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11.** *Molecular Biology and Evolution*, v. 38, n. 7, p. 3022-3027, 2021. Disponível em: [megasoftware.net](https://www.megasoftware.net).

22 ZHANG, J. et al. **Recent polyploidization events in three *Saccharum* founding species.** *Plant Biotechnology Journal*, v. 17, n. 1, p. 264–274, 7 jun. 2018.

23 ZHANG, G. et al. **The reference genome of *Miscanthus floridulus* illuminates the evolution of *Saccharinae*.** *Nature Plants*, v. 7, n. 5, p. 608–618, 1 maio 2021.

24 SCHNABLE, P. S. et al. **The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics.** *Science*, v. 326, n. 5956, p. 1112–1115, 20 nov. 2009.

25 STITZER, M. C. et al. **The genomic ecosystem of transposable elements in maize.** *PLOS Genetics*, v. 17, n. 10, p. e1009768, 14 out. 2021.

26 PANCHY, N.; LEHTI-SHIU, M.; SHIU, S.-H. **Evolution of Gene Duplication in Plants.** *Plant Physiology*, v. 171, n. 4, p. 2294–2316, 1 ago. 2016.