

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

TIEGO DE LA VEGA FERREIRA

**Análise Transcriptômica de Genes com Função Putativa na Diferenciação
Sexual de *Physcomitrium patens***

São Gabriel

2024

TIEGO DE LA VEGA FERREIRA

**Análise Transcriptômica de Genes com Função Putativa na Diferenciação
Sexual de *Physcomitrium patens***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas..

Orientador: Filipe de Carvalho Victoria

São Gabriel

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

F383a Ferreira, Tiego De La Vega

Análise Transcriptômica de Genes com Função Putativa na
Diferenciação Sexual de *Physcomitrium patens* / Tiego De La
Vega Ferreira.

40 p.

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2024.

"Orientação: Filipe de Carvalho Victoria Victoria".

1. Diferenciação Sexual. 2. Musgos. 3. Expressão Gênica. 4.
Evolução. 5. Biotecnologia. I. Título.

TIEGO DE LA VEGA FERREIRA

Análise Transcriptômica de Genes com Função Putativa na Diferenciação Sexual de *Physcomitrium patens*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Dissertação defendida e aprovada em: 26 de março de 2024.

Prof. Dr. Filipe de Carvalho Victoria
Orientador
UNIPAMPA

Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon
UFSC

Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo
UNIPAMPA

AGRADECIMENTOS

Eu não consigo imaginar um agradecimento que não seja uma continuação de tudo que eu disse na minha defesa de graduação, pois eu continuo tentando criar a minha história. E neste apenas um ano que se passou é como se eu tivesse vivido décadas, sentido emoções infinitas por uma quantidade imensurável de tempo. A vida às vezes parece efêmera, os dias parecem muitas vezes virarem semanas em questão de minutos e então eles já são meses e quando você pensa no futuro, percebe que o futuro já chegou, pois o futuro se torna o presente em milésimos de segundos e você já está vivenciando o futuro.

Quando penso que eu sou uma herança, fico pensando se eu conseguirei também deixar algo. O tempo vai passando e o que eu enxergava como meu futuro quando escrevi o meu primeiro agradecimento, hoje já se torna meu presente e amanhã, será meu passado. Quando se trata de viver, não há nada que faça mais sentido biológico do que deixar uma parte de si para outrem. Acho que enxergo essa pequena página de agradecimentos como algo de mim que não será apagado. Toda minha pesquisa poderá ser refutada, ela pode estar completamente errônea, pois o mundo muda tão depressa que nenhuma verdade é eterna, pois nenhuma resposta jamais irá satisfazer a curiosidade humana. Mas ainda assim, esse documento talvez, irá durar mais do que esse corpo e se durar, quem sabe o que palavras não são capazes de fazer.

Tudo é questão de não saber onde chegar, é questão de estar e conseguir ser suficiente com o que se têm em mãos, pois nenhuma doutrina será eterna, o status quo é uma falsa ilusão de estagnação do tempo. Por mais que haja momentos onde a sensação de inércia esteja sendo sufocante, ainda assim, haverá movimento.

Quando eu encerrei meu texto anterior de agradecimentos eu disse que as pessoas que passaram por mim, moldaram minha vida com a sua simples existência, então talvez esse ano eu só queira que se alguém ler isso, essa pessoa carregue um pedaço de mim nesses pequenos versos.

.RESUMO

A compreensão da diferenciação sexual em musgos, como *P. patens*, avançou significativamente com a identificação de uma rede de genes putativos envolvidos nesse processo. Essa rede inclui genes que regulam o desenvolvimento de órgãos reprodutivos e a sinalização entre células durante a diferenciação sexual. A metodologia adotada envolveu a análise de transcritos de tecidos gametogênicos específicos e a comparação com genes expressos em tecidos gametofíticos masculinos e femininos. Isso permitiu a identificação de genes diferencialmente expressos envolvidos na diferenciação sexual, contribuindo para uma compreensão mais profunda dos mecanismos moleculares subjacentes à evolução do desenvolvimento sexual em musgos não vasculares. A análise quantitativa dos transcritos revelou a expressão de mais de trinta e dois mil genes, com aproximadamente 36% mostrando nula ou baixa expressão em ambos os tecidos gametofíticos, indicando que uma parcela significativa do genoma não está diretamente relacionada à diferenciação sexual. No entanto, aproximadamente 6,8% e 6,5% dos genes apresentaram nula ou baixa expressão exclusivamente no anterídio ou arquegônio, respectivamente. Além disso, cerca de 35% dos genes foram expressos em ambos os tecidos, sugerindo uma possível contribuição para a maturação sexual do organismo. Os resultados também destacaram genes superexpressos exclusivamente em anterídios ou arquegônios, bem como genes sub expressos em um tecido e superexpressos no outro. Esses genes estão associados a funções como regulação gênica, formação de membranas, interação espermatozóide-ovócito e transporte celular, evidenciando a complexa regulação genética envolvida na diferenciação sexual de *P. patens*. Além disso, a análise revelou que a diferenciação sexual em musgos pode ser influenciada por fatores genéticos incluindo a presença de cromossomos sexuais e a poliploidia. Em suma, a pesquisa fornece insights importantes sobre os mecanismos de diferenciação sexual em musgos, contribuindo não apenas para a compreensão da evolução do desenvolvimento sexual mas também no avanço do conhecimento em biologia vegetal.

Palavras-chave: diferenciação sexual, musgos, expressão gênica, evolução, biotecnologia.

ABSTRACT

Understanding sexual differentiation in mosses, such as *P. patens*, has significantly advanced with the identification of a network of putative genes involved in this process. This network includes genes that regulate the development of reproductive organs and cell signaling during sexual differentiation. The methodology involved the analysis of transcripts from specific gametogenic tissues and comparison with genes expressed in male and female gametophytic tissues. This allowed the identification of differentially expressed genes involved in sexual differentiation, contributing to a deeper understanding of the molecular mechanisms underlying the evolution of sexual development in non-vascular mosses. Quantitative analysis of the transcripts revealed the expression of over thirty-two thousand genes, with approximately 36% showing null or low expression in both gametophytic tissues, indicating that a significant portion of the genome is not directly related to sexual differentiation. However, approximately 6.8% and 6.5% of genes showed null or low expression exclusively in the antheridia or archegonia, respectively. Additionally, about 35% of genes were expressed in both tissues, suggesting a possible contribution to the sexual maturation of the organism. The results also highlighted genes that were exclusively overexpressed in antheridia or archegonia, as well as genes underexpressed in one tissue and overexpressed in the other. These genes are associated with functions such as gene regulation, membrane formation, sperm-egg interaction, and cell transport, demonstrating the complex genetic regulation involved in the sexual differentiation of *P. patens*. Furthermore, the analysis revealed that sexual differentiation in mosses may be influenced by genetic factors including the presence of sex chromosomes and polyploidy. In summary, the research provides important insights into the mechanisms of sexual differentiation in mosses, contributing not only to understanding the evolution of sexual development but also to advancing knowledge in plant biology.

Keywords: sexual differentiation, mosses, gene expression, evolution, biotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mapa de calor dos genes diferencialmente expressos.....	18
Figura 2 -	Diagrama de Venn.....	19
Figura 3 -	Expressão do gene Pp3c24_930V3.1 em tecidos vegetativos.....	22
Figura 4 -	Expressão do gene Pp3c22_12750V3.1 em tecidos vegetativos.....	29
Figura 5 -	Gráfico de Distribuição de Genes nos Cromossomos.....	30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. HIPÓTESE.....	14
3. OBJETIVO.....	14
4. METODOLOGIA.....	15
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5.1. Genes super expressos em arquegônio e sub expressos em anterídios.....	20
5.2. Genes super expressos em anterídios e sub expressos em arquegônio.....	22
5.3. Diferenciação sexual.....	27
5.4. Genes e órgãos.....	30
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
7. REFERÊNCIAS.....	34

1. INTRODUÇÃO

As briófitas estão dentro do grupo de plantas terrestres e são possuidoras de morfologia simples e o ciclo de vida dominante do gametófito, que durante muito tempo levou alguns pesquisadores a concluir que essas espécies são primitivas (CRISP; COOK, 2005). Porém isso vem mudando com os avanços nas áreas de estudos evolutivos.

Esse avanço fez as briófitas ganharem popularidade na área e deixarem de serem vistos como somente um modelo “primitivo” no reino das plantas verdes (Viridiplantae) para ganharem autonomia e relevância na área de estudos evolutivos e de desenvolvimento bem como nos processos biológicos e genéticos com foco em estudos sobre a transição da água para a terra que ocorreu há pelo menos 500 milhões de anos (MORRIS *et al.*, 2018; SU *et al.*, 2021). Durante a transição de ambiente, as plantas passaram por diversas adaptações para lidar com os novos desafios como aumento de radiação de UV, danos ao DNA, temperaturas extremas, secas, relacionamentos simbióticos com outros organismos e mecanismos de defesas contra outros organismos (FERNANDEZ-POZO *et al.*, 2022).

Existem várias definições filogeneticamente aninhadas de plantas na comunidade científica (TIMME *et al.*, 2012). Alguns consideram que as Embryophyta representam o reino vegetal e que as estreptófitas e as clorófitas são grupos externos de algas. Outros consideram Streptophyta o agrupamento mais informativo do reino vegetal. A definição mais ampla do reino vegetal é Archaeplastida, que incorpora as rodófitas, glaucófitas e Viridiplantae (LEEBENS-MACK *et al.*, 2019; BOWES *et al.*, 2023). Aqui, utilizamos esta definição ampla de plantas mais estrita para plantas terrestres como Embryophyta (BOWES *et al.*, 2023).

Como o clado irmão das plantas vasculares (GITZENDANNER *et al.*, 2018; LEEBENS-MACK *et al.*, 2019; PUTTICK *et al.*, 2018) as briófitas passam a ter sua importância propulsionada na área de evolução e desenvolvimento (AYA *et al.*, 2011; HORST *et al.*, 2016). Uma das peculiaridades das briófitas é de serem capazes de se clonarem a partir de fragmentos do seu gametófito, o que faz elas serem de fácil replicação, ótimos produtores de biomassa em condições laboratoriais, baixa necessidade de manutenção e estrutura celular

simples, por isso são considerados ideais em trabalhos de estudos de vias metabólicas, transformação e recombinação homóloga de genes (LIU *et al.*, 2013).

Nesse grupo temos caracteres comuns entre esses indivíduos e indivíduos de outros reinos, como o *Homo sapiens sapiens* já que o seu esperma também é flagelar, por exemplo. Logo, temos esse um caráter comum dos eucariotos (STEWART; MATTOX, 1975; MITCHELL, 2007) que só foi perdido posteriormente em espécies como as gimnospermas e angiospermas que passaram a se reproduzirem a partir de polinização da espécie onde o gameta passou a ser completamente imóvel (RENZAGLIA; GARBARY, 2001) com exceção do ginkgo, uma gimnosperma, e as cicadáceas (“Botany online: History of discovery - spermatozoids - *Ginkgo biloba* - *Cycas revoluta*”, 2015).

Com expressivo interesse em trabalhos sobre inferências evolutivas do desenvolvimento em plantas e animais, grupos como as briófitas antes negligenciadas agora começam a ganhar espaço no cenário dos estudos evolutivos (PUTTICK *et al.*, 2018). Tendo sido relatado defeitos em homólogos de mamíferos e algas em determinado gene que acabam coincidindo na perda de fertilidade, temos uma demonstração de funções flagelares que estão relacionadas à fertilidade masculino em todos os reinos (MEYBERG *et al.*, 2020). Sendo assim, dentro das briófitas há organismos modelos, como é o caso da *Physcomitrella patens* que é um modelo de fácil acesso para estudos de genes homólogos em humanos.

P. patens é estudada desde o início do século passado sendo utilizado como modelo evolucionar e em trabalhos de evolução e desenvolvimento ao associá-lo a uma posição basal na filogenia transicional na conquista das plantas no ambiente terrestre (PUTTICK *et al.*, 2018; VAN GESSEL *et al.*, 2017). Sendo considerado o musgo modelo atualmente (RENSING *et al.*, 2020), possui o genoma e transcriptoma anotados e tem gerado dados para estudos da evolução, morfologia e fisiologia de plantas não vascularizadas (LANG *et al.*, 2008; SHAW *et al.*, 2004).

Apesar de todo conhecimento que se têm desse organismo, ainda não se sabe exatamente como os musgos fazem sua diferenciação sexual, a parte genética dos musgos pode ser comparada aos humanos em relação aos cromossomos sexuais X e Y uma vez que Taylor e colaboradores (1980)

descobrem a existência dos cromossomos sexuais em musgos e que se comparado com os humanos a distribuição sexual, não é bem compreendida (GOFFINET, 2008).

Havia considerável debate sobre a "determinação sexual" dos musgos, com alguns considerando fatores genéticos enquanto outros enfatizavam características fenotípicas (Doyle, 1970). No entanto, a partir de 1982, iniciaram-se esforços para integrar tanto a morfologia quanto a genética na definição da identidade sexual, sugerindo que a determinação sexual ocorre no esporófito, de forma semelhante à reprodução humana (RAMSEY, BERRY 1982). Mais recentemente, propôs-se que a determinação sexual em musgos ocorre principalmente durante a meiose. Conseqüentemente, apesar de possuírem os mesmos genes, algumas plantas podem exibir características dióicas enquanto outras exibem características monóicas (BACHTROG *et al.*, 2011).

Quando há defeito em algum gene, seja pela superexpressão ou subexpressão do mesmo, temos uma cascata de eventos imprevisíveis para o organismo (KAWADE *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2011). Logo, um gene responsivo pela formação de órgãos, temos que o seu defeito pode culminar na má formação do órgão ou na completa ausência do mesmo (OTERO; HELARIUTTA; BENITEZ-ALFONSO, 2016). Os musgos sendo possuidor de dimorfismo sexual (HOLÁ *et al.*, 2014; SANTOS; PEREIRA ALVARENGA; PÔRTO, 2018) faz com que se tenha um interesse impulsionado para diversas finalidades, pois ao compreender melhor a parte gênica de expressão de um organismo consegue-se um melhor entendimento sobre sua estrutura e sobre respostas para uma ampla gama de reações do indivíduo (ZIMMERMANN, 2018) como também elucidar melhor a parte de evolução e desenvolvimento e adaptações moleculares.

Com uma enorme dificuldade para entender a reprodução dos musgos e sua expressão gênica na hora da diferenciação e desenvolvimento sexual, pensou-se que uma análise dos seus transcritos obtidos dos tecidos gametogênicos específicos para produção das células germinativas masculinas (anterídios) comparada com os genes expressos obtidos de tecidos gametófitos femininos (arquegônios) poderia ajudar a compreender melhor os

mecanismos e genes envolvidos na diferenciação sexuais destas plantas.

2. HIPÓTESE

Considerando o contexto da introdução e os avanços recentes na compreensão da diferenciação sexual em musgos, e dado que os musgos, representados aqui pela espécie modelo *P. patens*, demonstram um dimorfismo sexual e que estudos anteriores identificaram um conjunto de genes putativos envolvidos na diferenciação sexual. Estuda-se essa rede de genes que pode ser composta por diferentes categorias funcionais, incluindo genes que regulam o desenvolvimento de órgãos reprodutivos masculinos e femininos, genes envolvidos na sinalização entre células durante a diferenciação sexual, e genes que controlam a expressão de características fenotípicas associadas ao sexo em *P. patens*.

A hipótese sugere que, ao analisar os transcritos obtidos de tecidos gametogênicos específicos (anterídios e arquegônios) e compará-los com os genes expressos em tecidos gametofíticos masculinos e femininos, respectivamente, será possível identificar um conjunto de genes diferencialmente expressos.

3. OBJETIVO

Descobrir os genes envolvidos nos mecanismos de evolução da diferenciação sexual de *P. patens*. Além disso, espera-se que esses genes identificados possam fornecer insights sobre os mecanismos moleculares subjacentes à evolução da diferenciação sexual em *P. patens* e, possivelmente, em outros musgos, contribuindo assim para uma compreensão mais abrangente da evolução do desenvolvimento sexual em plantas não vasculares. Com base nas informações apresentadas até o momento é possível que genes sejam realmente responsivos pela definição sexual nos musgos? Com eles conseguimos entender a diferenciação sexual do musgo?

3.1. OBJETIVO ESPECÍFICO

- Mecanismos de evolução que estão conectados à parte reprodutiva;
- Expansão de conhecimento em relação a ontologia;

- Função do gene em específico;
- Interconexões genéticas;
- Importância biológica.

4. METODOLOGIA

As sequências de *P. patens* utilizadas neste trabalho foram obtidas no banco de dados de *reads* de RNA do NCBI, o SRA (www.ncbi.nlm.nih.gov/sra), estas sequencias estão disponíveis através dos dados obtidos pelo grupo de pesquisa do Prof. Ralf Reski da Universidade de Freiburg, publicados recentemente (LÜTH *et al.*, 2023). Esses dados brutos foram obtidos de anterídios (gametângios masculinos) e arquegônios (gametângio feminino) e sequenciados separadamente pelo grupo de pesquisa citado acima. Todos os dados brutos dos sequenciamentos (*raw reads*) podem ser obtidos pelos vouchers de acesso SRR19502729, SRR19502730, SRR19502731, SRR19502732, SRR19502733 e SRR19502734, cada conjunto de *reads* foi considerada como uma réplica para fins de experimentos de análise de expressão diferencial.

A fim de manter a ordem dos arquivos e realizar as análises que necessitam maior esforço computacional a plataforma europeia do GALAXY (<https://usegalaxy.eu/>) foi utilizada. A ferramenta FASTQC (bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) serviu para a análise das qualidades das leituras de sequenciamento baixadas. Com base no gráfico de qualidade usou-se a ferramenta FASTQ quality filter (FASTX-toolkit, hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/contact.html) para remover as *reads* com qualidade inferior a $Q < 28$ e $equal < 70$ em cada conjunto de leituras.

As *raw reads* foram mapeadas contra o genoma de referência para *P. patens* (V3.3), disponível no Phytozome (https://phytozome-next.jgi.doe.gov/info/Ppatens_v3_3) para fins da anotação e identificação inicial de cada *read*, sabendo-se assim quais os genes são representados em cada um dos conjuntos de sequencias. A quantificação dos transcritos foi realizada utilizando Salmon (PATRO *et al.*, 2017), e os Transcritos por milhão de contagens (TPM) foram submetidos à análise de Expressão Diferencial (DE) através da ferramenta Degust 4.1.0 ([//degust.erc](http://degust.erc)).

monash.edu/) (POWELL, 2019). Os genes diferencialmente expressos (DEGs) foram normalizados usando o pacote DeSeq. Os genes regulados para cima e para baixo foram então visualizados em um mapa de calor usando ggplot no ambiente R (WICKHAM, 2016; R Core Team, 2021). Todos os DEGs foram submetidos à anotação e a ontologia genética foi enriquecida utilizando o protocolo TRAPID (BUCHINNI *et al.*, 2021). Assim, obtemos uma matriz com a quantidade de vezes que cada gene aparece em determinado conjunto de leituras, chamadas na análise de *counts per million* (CPM). A lista de genes expressa diferencialmente foi então submetida na plataforma Venny (<https://csbg.cnb.csic.es/BioinfoGP/venny.html>) e este por agrupamento de transcritos que separa os genes únicos para cada tratamento. Essa lista de genes únicos representa as expressões diferenciais em cada tratamento. Cada tratamento constou com 8 mil genes, onde foram pegos genes com maior expressão para anterídio e arquegônio, tal como foram pegos genes com expressão baixa ou nula para anterídio e arquegônio, comparando-os. No final tendo-se um gráfico de Venn representando a expressão de cada tratamento.

Após a listagem os genes de interesse são comparados com o banco de dados PEATMOSS (<https://peatmoss.plantcode.cup.uni-freiburg.de/>), para identificar a região expressa de cada gene conhecido e mapeado em *P. patens*. Essa análise comparou os transcritos de anterídios (masculino) e arquegônios (feminino) a fim de identificar diferenças na expressão gênica entre esses órgãos sexuais do musgo. Os genes também foram comparados na plataforma Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov>) para verificar proteínas homologas e espécies na qual a sequência se fazia presente.

Foi utilizado o PLAZA (<https://bioinformatics.psb.ugent.be>) em sua versão 4.5 para todos os 66 genes encontrados para ver as informações que a plataforma continha em relação aos identificadores de genes de cada gene e suas famílias de homólogos e ortólogos, tal como a função dos mesmos de acordo com a plataforma. A plataforma ensembl (<https://plants.ensembl.org>) juntamente com a plataforma CoGe (<https://genomevolution.org/>) serviram para validar o cromossomo que os genes estavam situados, o tamanho da sequência, tal como a função de acordo com os dados do ensembl (<https://plants.ensembl.org>).

Além disso, todos os genes passaram por um BLASTp na plataforma do

UNIPROT (<https://www.uniprot.org/blast>) utilizando o banco de dados do UNIPROT e do Swiss-Prot para uma análise de semelhança proteica e função. Onde foi possível analisar a taxonomia dos grupos presentes na semelhança proteica e a ontologia gênica (GO) e função dos mesmos, caso possuíssem anotações sobre. Além disso, todos os genes possuidores de GO foram analisados no quickGO (<https://www.ebi.ac.uk>) para fim de análise funcional, análise da evolução de ancestrais tal como os genes descendentes (*child terms*).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise quantitativa de transcritos, utilizando o *output* do algoritmo Salmon permitiu identificar mais de trinta e dois mil genes expressos. Utilizando uma amostragem de 8 mil genes mais e menos expressos (Figura 1), divididos em cada um dos tecidos gametogênicos (anterídio e arquegônio) de *P. patens*. No mapa de calor podemos observar os genes com regulação para cima inversamente proporcional em ambos tecidos, evidenciando que na formação de um tecido ocorre a super expressão para o desenvolvimento do processo enquanto no tecido antagônico ocorre justamente o processo inverso com a regulação para baixo.

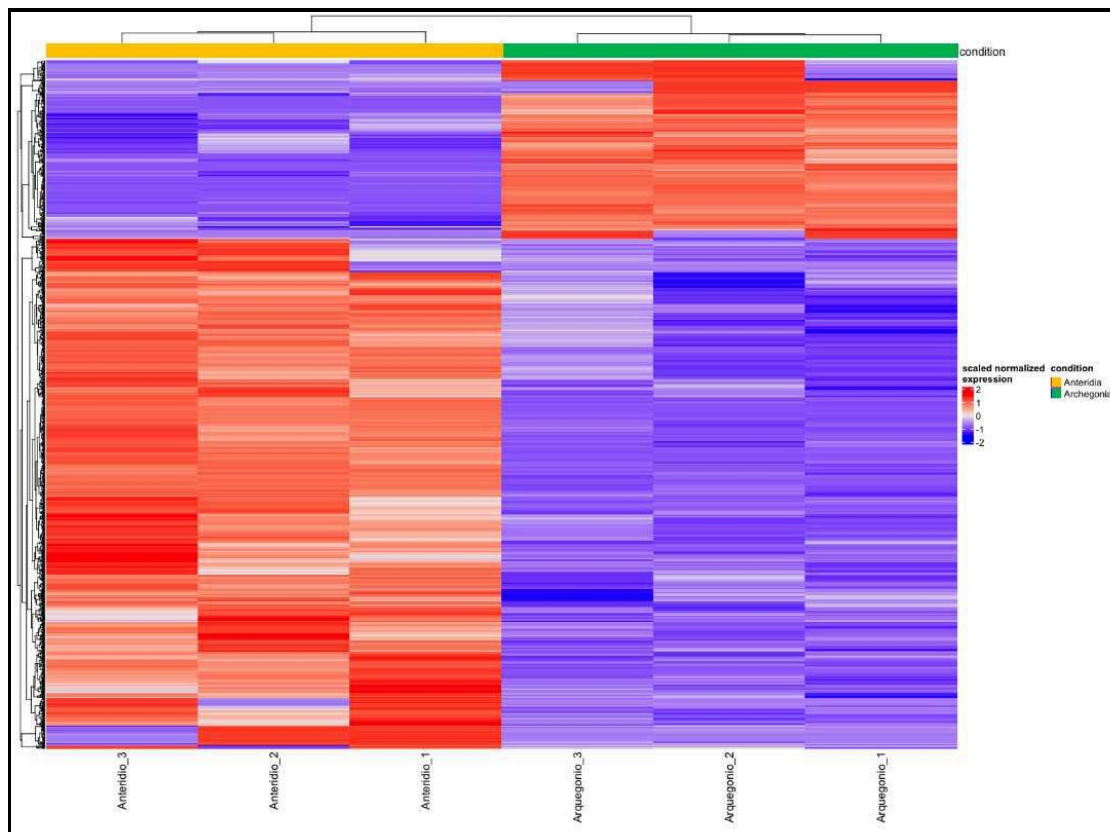


Figura 1 - Mapa de calor dos genes diferencialmente expressos e regulados para cima (escala de vermelho) e para baixo (escala de azul).

Além dos genes super ou sobre expressos foi possível identificar a ocorrência exclusiva em cada uma das condições (Figura 2). Uma grande parcela dos genes, cerca de 36%, estão com genes com nula ou baixa

expressão em ambos os tecidos. Então temos um quantitativo dos genes do organismo *P. patens* não sendo exclusivamente responsivos à diferenciação sexual, sugerindo que a grande parte dos genes não estão relacionados a diferenciação sexual ou maturação sexual do organismo e sim, são responsivos para outras fases do desenvolvimento e manutenção do organismo, ainda que, precise ser feito uma análise dos genes de tecidos gametófitos para que de fato seja possível afirmar que determinados genes estão exclusivamente relacionados a determinada fase reprodutiva do organismo. Porém, por se tratar de tratamentos diferentes, arquegônio e anterídio, isso nos gera resultados onde temos que há genes que somente não são expressos em determinados tipos de tecidos, sendo 6,5% para o arquegônio e 6,8% para o anterídio se considerarmos somente os dois.

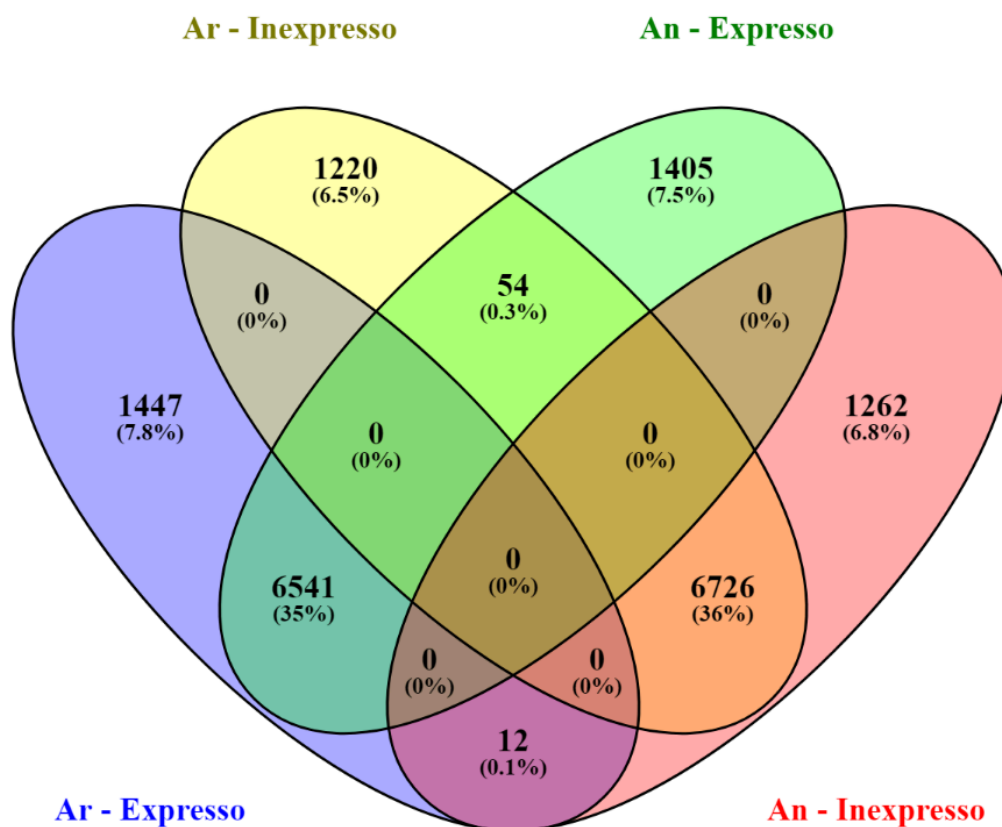


Figura 2 - Diagrama de Venn. **Ar** representa arquegônio e **An** representa anterídio. Cerca de 36%, dos genes estão com nula ou baixa expressão no anterídio e no arquegônio. Enquanto isso, 6,8% e 6,5% possuem nula ou baixa expressão somente no anterídio ou no arquegônio respectivamente. Cerca de 35% dos genes são expressos tanto no anterídio quanto no arquegônio. Enquanto isso, 7,8% e 7,5% são expressos somente no anterídio ou no arquegônio respectivamente. Somente 0,1% dos genes se

mostram com expressão baixa ou nula no anterídio e se mostram superexpressos no arquegônio. E 0,3% dos genes se mostram com baixa ou nula expressão no arquegônio e se mostram superexpressos no anterídio.

Contudo, o oposto também se mostrou relevante, cerca de 35% dos genes estão expressos em ambos os tecidos, ou seja, são genes putativamente responsivos pela maturação sexual do organismo, ou possuem algum papel no desenvolvimento sexual e manutenção da vida de acordo com a análise. E o mesmo que ocorre com os genes de baixa expressão, ocorre com os de alta expressão, pois temos que 7,8% dos genes do arquegônio são super expressos somente neste tipo de amostragem e cerca de 7,5% dos genes do anterídio são super expressos somente nesse tipo de tecido.

No intuito de tentar compreender melhor a diferenciação sexual dos organismos, o foco acaba sendo então para os genes dos tecidos que mostram não estarem expressos em determinado tecido e mostram estarem expressos no tecido sexual oposto. Com isso temos que 0,1% dos genes estavam super expressos no arquegônio e mostravam expressão baixa ou nula no anterídio. E o oposto também se observou, cerca de 0,3% dos genes estavam super expressos no anterídio e mostravam expressão baixa ou nula no arquegônio. Com esses genes que estavam expressos em um determinado tecido e não estavam em outro, obteve-se uma totalização de 66 genes, e esses genes acabaram sendo selecionados para as análises posteriores a fim de discutir a provável relação destes com a diferenciação sexual em *P. patens*.

Em uma análise inicial na plataforma PEATmoss, têm-se que 44 dos 66 genes configuram proteínas desconhecidas. Com 66,6% dos genes sendo desconhecidos ou não possuindo homólogos, ortólogos ou GO, a abordagem para o tratamento dos genes teve que ser individual e a análise teve que passar por diversas plataformas, diminuindo então para 12,12% os genes completamente desconhecidos ou sem nenhum tipo de homologia.

5.1. Genes super expressos em arquegônio e sub expressos em anterídios

Com os resultados de 0,1% temos então 12 genes que estão somente expressos no arquegônio e estão sub expressos no anterídio, eles são:

Pp3c19_7491V3.1, Pp3c2_11050V3.1, Pp3c2_13220V3.1, Pp3c16_2530V3.1, Pp3c3_30077V3.1, Pp3c24_930V3.1, Pp3s97_10V3.1, Pp3c14_9620V3.1, Pp3c26_2950V3.1, Pp3c12_14170V3.1, Pp3c5_70V3.1, Pp3c4_17610V3.1. Desses 12 genes, dois continuaram como genes com função desconhecida, porém, todos se mostraram codificadores de proteínas de acordo com o a base de dados do ensembl (<https://plants.ensembl.org/>) e um deles (Pp3c24_930V3.1) se mostrou além de codificador de proteína, um gene de RNA, mais precisamente tRNA o que mostra de fato a complexidade do genoma e suas funções e adaptações.

O gene Pp3c2_11050V3.1 não há muitas informações se relacionado com a *p. patens*, porém, ele possui uma homologia com a proteína de outros organismos acima de 51%, onde se é anotado como uma proteína com diversas funções que incluem regulação gênica para reprodução e diferenciação de células germinativas ou regulação hormonal. Enquanto isso, o Pp3c16_2530V3.1 é referente a uma parte da bicamada lipídica da membrana, sendo que ele também pode vir a ser relevante no processo de sinalização para a diferenciação sexual. Sendo o Pp3c3_30077V3.1 também responsável pela membrana responsável pelos canais iônicos, que são considerados essenciais para que o esperma e o oócito madurem, e consigam se comunicar. (PINART, 2022; DARZON *et al.*, 1999).

O principal resultado ligando a homologia proteica do Pp3c24_930V3.1, está relacionado com a RNA polimerase II, que tem funções importantes para a expressão gênica apropriada e conclusão da meiose (KAYE *et al.*, 2024) onde há um impacto direto na reprodução, com destaque no arquegônio (Figura 3). A plataforma UniProt não fornece muitas informações adicionais sobre o gene Pp3c4_17610V3.1, contudo, a plataforma ressalta que há um homólogo chamado BUD31, que por sua vez, é uma proteína que está envolvida no processo de splicing de mRNA, através do spliceossomo, e na regulação positiva da atividade do receptor de androgênio (“BUD31 BUD31 homolog [*Homo sapiens* (human)] - Gene - NCBI”, [s.d.]). Para outro gene, a nudix hidrolase é a principal proteína, no Pp3c5_70V3.1 essa proteína está presente em uma grande gama de homólogos na plataforma UniProt e ela está diretamente relacionada a órgão reprodutores (OGAWA *et al.*, 2008), incluindo

o pólen e órgãos masculinos de angiospermas, não sendo exclusiva de órgão femininos em todos os seus homólogos.

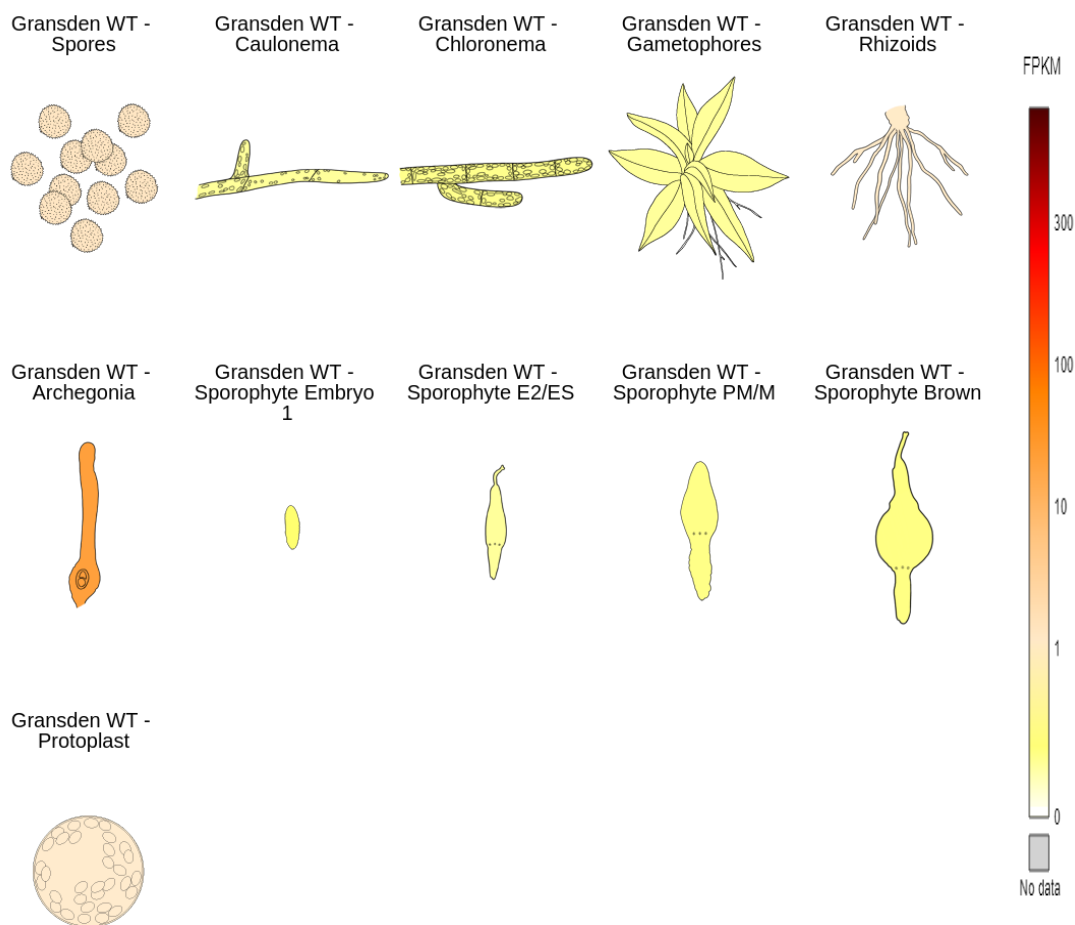


Figura 3 - Expressão do gene Pp3c24_930V3.1 em tecidos vegetativos. Baseado na expressão diferencial obtida pela análise de expressão normalizada no PEATMOSS, onde se é possível observar que está super expresso no arquegônio. FPKM = Fragmentos por kilobase por milhão de reads sequenciados, onde em vermelho identificam maior expressão e amarelo menor expressão do alvo testado.

5.2. Genes super expressos em anterídios e sub expressos em arquegônio

Com os resultados de 0,3% temos então 54 genes que estão somente expressos no anterídio e estão subexpressos no arquegônio, eles são: Pp3c16_8490V3.1, Pp3c18_4970V3.1, Pp3c22_10527V3.1, Pp3c15_20260V3.1, Pp3c22_12750V3.1, Pp3c9_5561V3.1, Pp3c8_7690V3.1, Pp3c17_2102V3.1, Pp3c9_23290V3.1, Pp3c21_6900V3.1, Pp3c15_20380V3.1, Pp3c3_2570V3.1, Pp3c18_1990V3.1, Pp3c6_23540V3.1, Pp3c6_4670V3.1, Pp3c20_12020V3.1, Pp3c20_16400V3.1, Pp3c17_2760V3.1, Pp3c5_2540V3.1,

Pp3c6_24630V3.1, Pp3c2_18530V3.1, Pp3c18_14610V3.1,
 Pp3c10_23110V3.1, Pp3c3_30780V3.1, Pp3c20_1480V3.1, Pp3c3_12720V3.1,
 Pp3c13_24117V3.1, Pp3c11_9530V3.1, Pp3c24_12970V3.1
 Pp3c16_2050V3.1, Pp3c23_8140V3.1, Pp3c23_2880V3.1, Pp3c11_10010V3.1,
 Pp3c7_8270V3.1, Pp3c7_25800V3.1, Pp3c3_32090V3.1, Pp3c26_600V3.1,
 Pp3c3_24330V3.1, Pp3c5_22130V3.1, Pp3c6_11150V3.1, Pp3c8_21110V3.1,
 Pp3c23_2580V3.1, Pp3c9_6080V3.1, Pp3c15_21800V3.1, Pp3c22_10530V3.1,
 Pp3c24_11860V3.1, Pp3c24_1460V3.1, Pp3c1_18700V3.1,
 Pp3c10_14830V3.1, Pp3c4_20771V3.1, Pp3c12_19393V3.1,
 Pp3c7_23570V3.1, Pp3c7_8480V3.1 e Pp3c11_870V3.1. Desses 54 genes,
 seis continuaram como genes com função desconhecida, porém, todos se
 mostraram codificadores de proteínas de acordo com o a base de dados do
 ensembl (<https://plants.ensembl.org/>) e dois deles (Pp3c11_870V3 .1,
 Pp3c10_14830V3.1) se mostrou além de codificador de proteína, genes de
 RNA, mais precisamente ensRNA e snRNA, respectivamente, o que mostra de
 fato a complexidade do genoma e suas funções e adaptações.

Com a escassez de bancos de dados com dados somente de plantas para analisar todas as sequências de proteínas, foi-se usado um banco de dados de organismos geral (UniProt) e isso resultou em um acervo de organismos diversos. Vale ressaltar que os resultados focam-se em homologia proteica, que tende a manter uma semelhança funcional de acordo com sua estrutura tridimensional. Enquanto a homologia gênica não significa um efeito semelhante, porém os resultados são comparativos com regiões sexuais da planta ou não, em relação a diversos organismos.

As anotações e homólogos proteicos mais aparentes nos genes Pp3c22_10527V3.1, Pp3c17_2102V3.1 e Pp3c22_10530V3.1, foram a tioredoxina. A tioredoxina não está ligada somente a estresse oxidativo, ela tem vários papéis importantes nos processos reprodutivos do ciclo reprodutivo feminino (OSBORNE *et al.*, 2001), porém, também se faz essencial na espermatogênese e na fertilidade masculina, onde é abundantemente expresso nos testículos dos tetrápodes, e ainda estudos demonstram que *knockout* na tioredoxina de camundongos machos, diminui a sua fertilidade (DOU *et al.*, 2022), mostrando a importância da tioredoxina na fertilidade masculina. Sugerindo que há uma associação entre a quantidade de tioredoxina e a

qualidade do esperma, pois se houver uma redução na quantidade de tioredoxina, isso pode levar a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem vir a danificar o esperma e reduzir sua motilidade (MORADI *et al.*, 2018). Então a tioredoxina se torna essencial para a maturação e desenvolvimento sexual, tal como para a fertilidade espermática.

O retrotransposon Ty-1 ficou aparente em dois resultados, Pp3c1_18700V3.1 e Pp3c15_20380V3.1. O Ty-1 já vem sendo estudado para estudo evolutivos em angiosperma (HUANG *et al.*, 2017; GALINDO-GONZÁLEZ *et al.*, 2016), a pesquisa demonstrou que famílias específicas de Ty-1 estão ativas desde o início da reprodução em linho, indicando atividade transposicional contínua e potencial de diversidade genômica no organismo. (GALINDO-GONZÁLEZ *et al.*, 2016).

Ainda que o Ty-1 não esteja relacionado diretamente de acordo com a literatura, discussões sobre a regulação dos elementos transponíveis (TEs) durante a reprodução sexual do grupo viridiplantae incluindo as implicações de fertilidade, já é algo que vem sendo estudado como a exploração do papel das modificações epigenéticas, como pequenos RNAs, metilação do DNA e marcas repressivas de histonas, no controle da expressão e atividade de TE ao longo do ciclo de vida da planta. (KANNAN PACHAMUTHU; BORGES, 2023). Surge, portanto, a importância dos estudos sobre a atividade dos TEs para entender sua regulação epigenética, mostrando os TEs como possíveis candidatos na cadeia de regulação de reprodução das plantas.

Há genes como Pp3c9_5561V3.1 e Pp3c16_8490V3.1 que sua função exata é desconhecida, mas possui anotações em seus GOs que são encontradas no *European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute* (EMBL-EBI) que fornecem informações importantes como os *child terms* que seriam termos descendentes em relação a um GO, salientando uma hierarquia estrutural nessa ontologia. Este termo é usado tanto para o GO como para o *Evidence Code Ontology* (ECO) onde ele organiza os termos num contexto biológico fazendo com que haja uma facilidade na organização de informações de maneira hierárquica organizando assim a categorização dos processos e das funções em diferentes níveis que venham a facilitar a pesquisa e recuperação da análise dos dados com a finalidade de encontrar informações específicas.

No caso desses dois genes, os seus GOs acabam sendo GOs de membrana, onde na área de EVO-DEVO a sua relevância se dá pelo auxílio em descrições de sistemas complexos e que estão muitas vezes interligados. Com uma gama de processos e funções moleculares e/ou celulares envolvidos alguns *child terms* onde muitos deles podem inicialmente não parecerem estar ligados diretamente a diferenciação sexual pelo fato de serem genes onde o GO está somente relacionado à membrana. Todavia, muitos desses GOs fazem parte de membranas específicas, tais como: membrana do prósporo (GO:0005628), membrana interna do esporo (GO:0140549), membrana do ascus (GO:0036362), membrana fotossintética (GO:0034357), entre outros.

A homologia genética relacionada à reprodução de musgos pode ser explorada em estudos comparativos com outros organismos. Tendo o ascus como exemplo, um ascus é uma estrutura encontrada em fungos ascomicetos que contém ascósporos, que são células reprodutivas (KRUG; BENNY; KELLER, 2004). Porém, quando se trata de membrana temos exemplos como o gene Pp3c23_8140V3.1, segundo os bancos de dados do UniProt e Swiss-Prot, temos com a proteína da *P. patens* que é uma proteína com função desconhecida, uma semelhança com quase 70% com a proteína do *Myotis brandtii*, que as anotações da plataforma sugerem ser uma proteína de membrana.

As anotações dessa proteína de membrana a classificam como uma *outer dense fiber protein 4*, essa proteína de fibra densa externa está relacionada a diversos outros organismos como uma proteína de membrana, porém da membrana do esperma de diversos organismos (ZHAO *et al.*, 2017; BROHMANN; PINNECKE; HOYER-FENDER, 1997), com anotações de 202 mamíferos segundo o NCBI (“ODF4 orthologs”, [s.d.]) até o momento. Enquanto Pp3c3_12720V3.1 também é uma proteína de membrana, conhecida como transmembrane 9, com homologia acima de 80% com a outras plantas, incluindo *Arabidopsis thaliana*, essa proteína é responsável para a fertilização, pois é necessária para adesão celular, além de funcionar como uma molécula de sinalização (SINGSON; MERCER; L’HERNAULT, 1998; Putiri E *et al.*, 2004).

Em relação a membrana fotossintética, os genes Pp3c11_10010V3.1 e Pp3c7_25800V3.1 tiveram suas anotações com semelhanças proteicas em tecidos relacionados a UV-B. Mesmo sendo um gene relacionado a proteínas

de membrana, a radiação UV-B afeta as características reprodutivas das plantas e pode ter efeitos diretos e indiretos na reprodução sexual das plantas, como deformação de partes reprodutivas, ou diminuição de tamanho (KOTI, 2005). Sendo que os efeitos da radiação UV-B na reprodução das plantas são complexos e podem variar dependendo das espécies, populações e condições ambientais (LLORENS *et al.*, 2015).

Outro resultado interessante foi Pp3c5_22130V3.1 onde foi encontrado semelhanças com samambaias, que estavam relacionadas a transferase fucose. Sendo que, a fucosiltransferase-5 está envolvida na interação entre espermatozoides humanos e células epiteliais do oviduto, o que melhora a capacidade de fertilização dos espermatozoides e os protege de danos oxidativos (HUANG *et al.*, 2015) sendo a transferase fucose um auxiliador na manutenção da qualidade espermática.

Ainda que diversos genes tenham correspondido a homólogos de enzimas de hidrolase, a classe dessas enzimas é muito diversificada e pode ter diversas funções em órgãos como a bile (SHUKLA; D. BENDRE; M. GAIKWAD, 2022) ou até mesmo estar presente em processos placentários durante a gestação humana (BERGER; ALLERKAMP; WADSACK, 2022), sendo assim, uma enzima muito ampla e de difícil catalogação funcional, porém que esteve presente em diversos resultados.

O mesmo se aplica para o gene Pp3c5_2540V3.1, que por mais que seja o único que possua homólogo com a proteína Mucin 2, essa proteína está presente tanto na proteção do útero durante o parto de camundongos (ZHANG *et al.*, 2022) quanto na proteção do sistema digestório (SHIZUE; MELO, 2018), lubrificando e protegendo os tecidos. No entanto, a proteína mucin já se mostrou essencial na espermatogênese de humanos, onde a infertilidade estava ligada a falta de mucin 1 (JU TAE SEO *et al.*, 2005).

Proteínas como mucin que possuem mais de um homólogo, onde se tem origem comum e estrutura semelhantes, mas funções e efeitos biológicos distintos, também é encontrado em outro gene, porém, dessa vez é a proteína IGFBP (*Insulin-like Growth Factor Binding Protein*) que foi encontrada proteínas homólogas de IGF no gene Pp3c3_32090V3.1. Esta proteína é comumente encontrada no trato genital masculino de *homo sapiens*, onde concentrações plasmáticas seminais de IGFBP-3 diminuem após a vasectomia o que leva a

uma diminuição do conteúdo total ejaculado mesmo que os níveis de IGFBP-1 e IGFBP-2 permaneçam inalterados (OVESEN; FLYVBJERG; ØRSKOV, 1995), ressaltando a especificação de cada proteína.

O gene Pp3c7_8480V3.1 está ligado a proteínas peroxissomais, que demonstram heterogeneidade de conteúdo proteico de peroxissoma em diferentes tipos de células do testículo humano e de camundongo, porém demonstra um papel importante na espermatogênese e no metabolismo lipídico das células de Sertoli, onde *knockout* da peroxissoma resulta em parada na espermatogênese (NENICU *et al.*, 2007; BRAUNS *et al.*, 2019).

O gene Pp3c24_1460V3.1, também conhecido como AT5G54800 em *Arabidopsis thaliana*, codifica um transportador de glicose 6-fosfato/fosfato 1, o interessante sobre esse transportador é que ele também desempenha um papel essencial na maturação do pólen e no desenvolvimento do saco embrionário, além disso ele se expressa em diversos estágios e isso inclui estágio de maturação do pólen, na floração ou diferenciação de tecidos da pétala (“AT5G54800(GPT1)”, [s.d.]). Portanto, mesmo esses órgãos não estando presentes em órgãos de briófitas, pelo fato da homologia deles serem tão próximos, isso embasa que genes como esse, podem estar envolvidos no sistema reprodutivo de briófitas.

Há genes que possuem ligação mais direta com o espermatozóides ou anterozóides como o gene Pp3c7_8270V3.1 que é responsável por cílios móveis, estruturas celulares especializadas que desempenham papéis importantes em processos como a locomoção de espermatozoides (GARD, 1992), logo, o desenvolvimento dos cílios móveis no espermatozóides é essencial para o ciclo reprodutivo. Além de ser um gene responsável pela dineína que por sua vez é uma das proteínas responsáveis pela geração e regulação dos cílios e flagelos (APREA *et al.*, 2021).

Em suma, esses resultados acabam corroborando que boa parte dos genes apresentados, acabam se enquadrando com um resultado esperado em caso de superexpressão do anterídio, pois boa parte deles estavam diretamente ligados ao sistema reprodutor masculino de diversos organismos, todos apresentando um grande grau de homologia proteica.

5.3. Diferenciação sexual

A diferenciação sexual é vista geralmente de forma binária, onde irá existir um macho e uma fêmea, pelos padrões de mamíferos XX/XY, normalmente se é considerado a fêmea sendo XX e o macho sendo XY. Em contrapartida, as briófitas, mesmo haplóides, possuem um sistema sexual, sendo conhecido como UV. As fêmeas herdam um cromossomo U e machos herdam um cromossomo V. A questão é que o espectro de diferenciação sexual do *Homo sapiens sapiens* não é uma regra e há outras conformações com outros meios de diferenciação sexual.

Mesmo se tratando de mamíferos, temos inúmeras espécies que fogem do considerado padrão XX/XY (SAUNDERS; VEYRUNES, 2021). O trabalho de Saunders *et al.*, 2021 lista inúmeras espécies de mamíferos que são negligenciadas em estudos de diferenciação sexual. Um exemplo sendo a espécie *Lasiopodomys Mandarinus* onde as fêmeas podem possuir XX ou X0, sendo então as fêmeas possuidoras do X0 possuidoras somente de um cromossomo X. Isso sugere que as fêmeas X0 podem ter um cromossomo X superdesenvolvido em comparação com as fêmeas XX (ROMANENKO *et al.*, 2020; SAUNDERS; VEYRUNES, 2021). Sendo assim, ainda que haja diferenças, o cromossomo X superdesenvolvido em uma fêmea X0 poderia ser considerado semelhante a um cromossomo haplóide sexual, resultando em semelhanças às funções de cromossomos haplóides.

Alguns répteis usam genes para a diferenciação sexual, sendo *Apalone spinifera* um exemplo que depende de genes que estão relacionados à temperatura para a sua determinação sexual (GREENBAUM; CARR, 2001). Há também casos de alguns peixes como *Amphiprion ocellaris* onde a diferenciação sexual está relacionada com a ascensão social na vida adulta, onde essa espécie passa parte da sua vida como macho e quando se torna dominante na hierarquia social, ele muda para fêmea (PARKER *et al.*, 2023).

Com esses exemplos, fica evidente que o mesmo vale para outros reinos, inclusive briófitas, pois há diversas formas de reprodução e maturação sexual e muitas diferem de um organismo para outro. O olhar binário e conservativo de diferenciação sexual pode acabar se tornando um paradigma a ser quebrado. Dentro do grupo das briófitas temos *Sphagnum*, um musgo. Além do *Sphagnum* ser predominantemente dióico, há espécies monóicas (SUNDBERG; RYDIN, 2002) o que faz a própria espécie não seguir um padrão.

E com novas descobertas têm-se cromossomos considerados putativos para o *Sphagnum*. Porém, eles são somente putativos, pois há uma interação complexa dos cromossomos sexuais com os cromossomos autossômicos que afetam o crescimento da espécie em diferentes condições de pH (HEALEY *et al.*, 2023). Isso sugere então uma interação entre cromossomos sexuais, cromossomos não sexuais e ainda adiciona mais uma camada de complexidade juntamente com genes regulatórios temos o ambiente e o seu pH, como observado na figura 4.

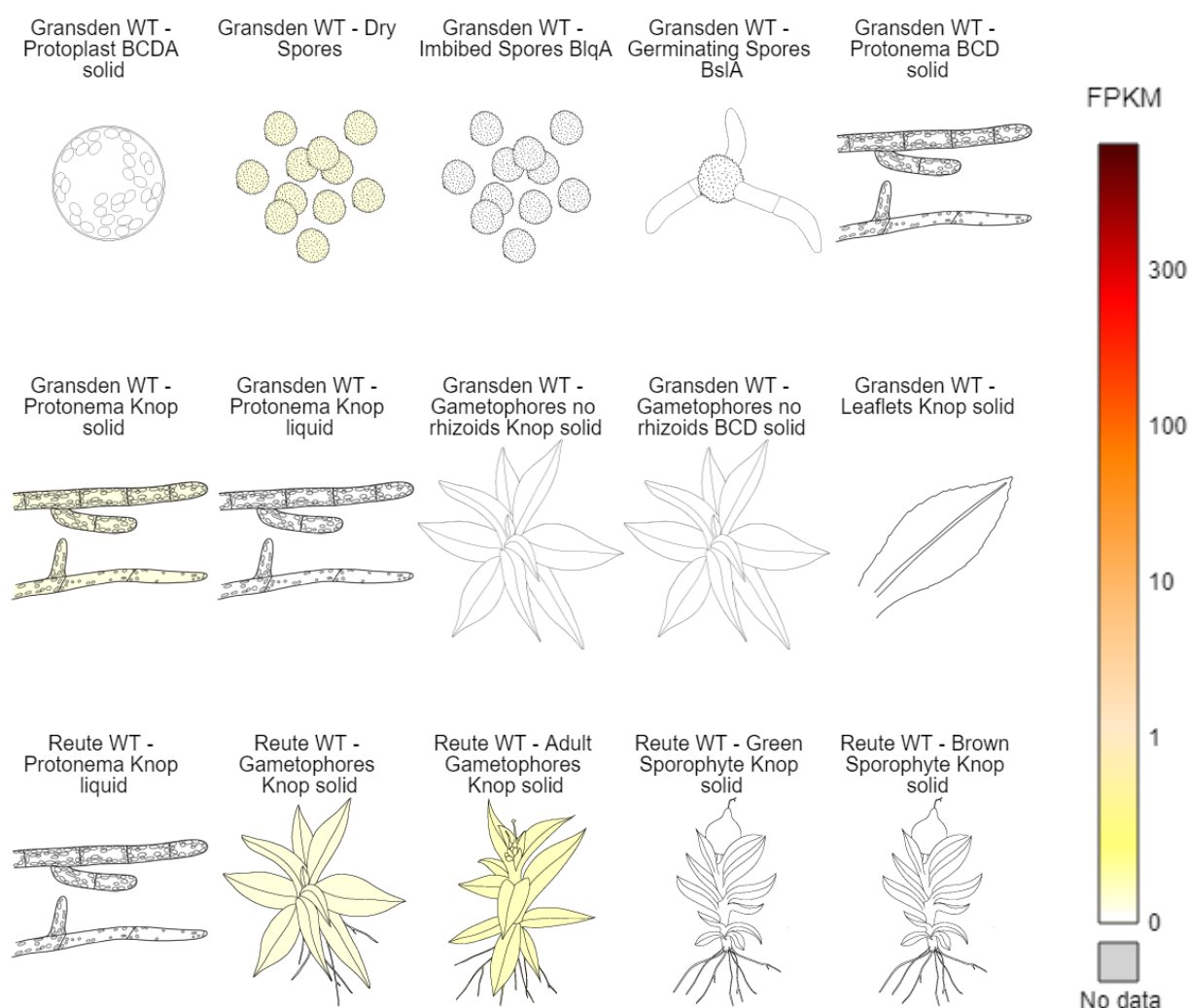


Figura 4 - Expressão do gene Pp3c22_12750V3.1 em tecidos vegetativos. Baseado na expressão diferencial obtida pela análise de expressão normalizada no PEATMOSS, onde se é possível observar que somente no esporo e no protonema em meio sólido o gene foi expresso, sendo o ambiente um estimulante para expressão de alguns genes.

FPKM = Fragmentos por kilobase por milhão de *reads* sequenciados, onde em vermelho identificam

maior expressão e amarelo menor expressão do alvo testado.

Por mais que a determinação sexual de plantas carregam consigo os cromossomos sexuais U e V e eles sejam vistos como reguladores sexuais em musgos, têm-se exemplo do genoma de musgos como *Ceratodon purpureus* que é relativamente pequeno, porém o problema é que os cromossomos sexuais são extensos (CAREY *et al.*, 2021). e isso implica que a degeneração de cromossomos sexuais pode ser extremamente baixa, algo consistente com hipóteses de determinação sexual genética não somente cromossômica, já que os genes muitas vezes ligados a processos de diferenciação sexual não são exclusivos de uma pequena gama de cromossomos (Figura 5).

Devido a poliploidia, presença de múltiplos conjuntos de cromossomos nas células, as briófitas possuem maior estabilidade genômica e adaptabilidade em certos contextos. Esses organismos poliplóides possuem uma perda menor de genes, pois essas cópias extras podem compensar mutações deletérias, mantendo funções essenciais e aumentando adaptabilidade e resiliência a ambientes em constante mudança (CHARLESWORTH, 2022; JESSON; CAVANAGH; PERLEY, 2010).

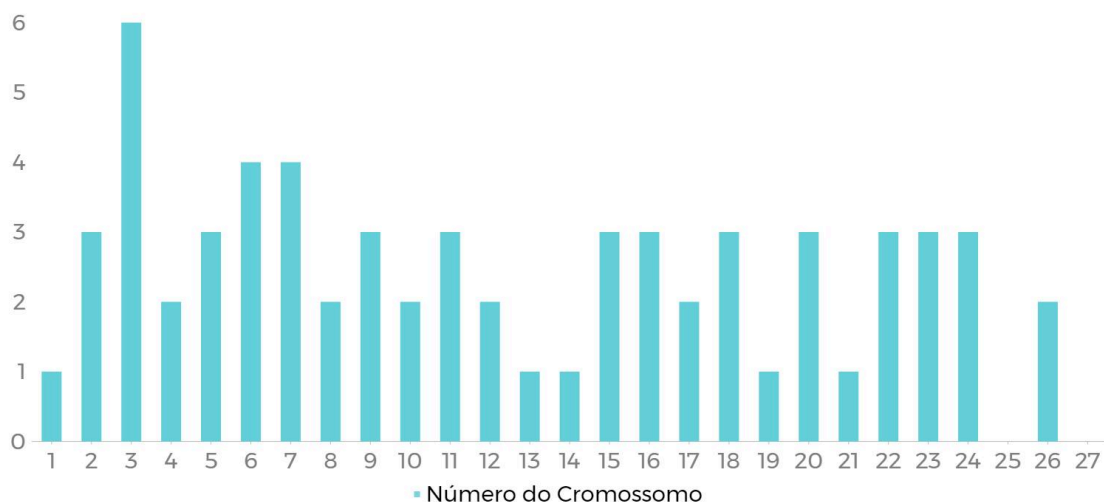


Figura 5 - Gráfico de Distribuição de Genes nos Cromossomos. Este gráfico mostra a distribuição dos 66 genes identificados durante a análise nos 27 cromossomos. Cada barra representa um cromossomo, e a altura da barra indica o número de genes localizados nesse cromossomo.

JULCA, I. *et al.*, 2021 observou que, em média, 21% dos genes de cada espécie vegetal analisada são identificados como genes específicos de órgãos. Esses genes desempenham papéis cruciais na função e estabelecimento dos órgãos e tipos celulares correspondentes, sugerindo uma especialização e diversidade funcional dos genes em diferentes órgãos e tecidos, além de salientar que grupos ortólogos masculinos têm melhor preservação em relação ao feminino e possuem mais inovação, onde novos genes são geralmente expresso em tecidos reprodutivos masculinos (BEGUN *et al.*, 2007; CUI *et al.*, 2015; JULCA *et al.*, 2021).

A maior dinamicidade e inovação observadas nos gametas masculinos podem ser atribuídas ao seu papel ativo na fertilização e na ativação do ovócito. Estudos demonstraram que os espermatozoides desempenham um papel essencial não apenas ao contribuir com seu DNA, mas também ao fornecer proteínas e fatores específicos que influenciam a ativação do ovócito e o início do desenvolvimento embrionário (ZAFAR; LU; LI, 2021). Essa interação entre os gametas masculinos e femininos é fundamental para compreendermos os mecanismos moleculares envolvidos na diferenciação sexual dos musgos, especialmente considerando o sistema de determinação sexual UV e a complexidade dos cromossomos sexuais e não sexuais. Portanto, é importante destacar que as inovações genéticas não se limitam ao gameta masculino, mas envolvem uma interação dinâmica entre ambos os gametas e os processos moleculares que regem a reprodução dos musgos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com foco em genes que estavam expressos em um órgão reprodutivo e sub expresso ou com expressão nula no outro, essa análise de dados, ressalta possíveis genes putativos que podem ser responsáveis pela representação genotípica e fenotípica da diferenciação sexual dos musgos.

Pesquisas de diferenciação sexual e desenvolvimento de órgãos em briófitas como a *P. patens* trazem consigo um valor científico que está diretamente ligado a aplicações biotecnológicas, compreensão da evolução das viridiplantae, tal como possibilita o esclarecimento em áreas que possam usufruir do conhecimento futuramente como áreas de aplicações práticas como a agricultura, engenharia genética como melhor compreensão para determinadas funções biológicas que possam ser usadas para fundamentar técnicas através da homologia gênica. Ao compreender melhor a parte de expressão gênica de um organismo consegue-se um melhor entendimento sobre sua estrutura e juntamente com respostas para uma ampla gama de reações do indivíduo (ZIMMERMANN, 2018).

Por mais que inicialmente uma proteína seja somente identificada como uma proteína de membrana como ocorreu diversas vezes em análises iniciais, análises posteriores mostraram características únicas da mesma. Então genes e proteínas que possuem uma homologia com outros, podem compartilhar características com valores significativos para diversos estudos, tornando genes desconhecidos em genes putativos para funções de importância funcional e no caso dessas análises, genes de implicações para diferenciação sexual e reprodução de musgos.

O grau de conservação de homólogos (ortólogos) de genes relacionados a órgãos masculinos em *P. patens*, nos sugere a plausibilidade dos genes investigados atuarem na regulação da diferenciação sexual desta planta. Essa conservação genômica proporciona uma base sólida para as conclusões nesse estudo, aumentando a confiabilidade dos dados obtidos e sua relevância para aplicações biotecnológicas, como *knock-out* e demais estratégias de transformação ou manipulação gênica. Estudos do tipo possuem importância para a compreensão mais ampla da evolução das Viridiplantae. E esperamos, a continuidade desta pesquisa, resultados práticos para o

entendimento dos processos regulatórios envolvidos com a diferenciação sexual em *P. patens*, bem como outras Embryophyta.

7. REFERÊNCIAS

APREA, I. et al. Defects in the cytoplasmic assembly of axonemal dynein arms cause morphological abnormalities and dysmotility in sperm cells leading to male infertility. **PLOS Genetics**, v. 17, n. 2, p. e1009306, 26 fev. 2021.

AT5G54800(GPT1). Disponível em: <<https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=locus&name=AT5G54800>>. Acesso em: 18 dez. 2024.

AYA, K. et al. The Gibberellin perception system evolved to regulate a pre-existing GAMYB-mediated system during land plant evolution. **Nature Communications**, v. 2, n. 1, p. 544, 22 nov. 2011.

BACHTROG, D. et al. Are all sex chromosomes created equal? **Trends in Genetics**, v. 27, n. 9, p. 350–357, set. 2011.

BEGUN, D. R. et al. Evidence for de Novo Evolution of Testis-Expressed Genes in the *Drosophila yakuba/Drosophila erecta* Clade. **Genetics**, v. 176, n. 2, p. 1131–1137, 1 jun. 2007.

BERGER, N.; ALLERKAMP, H.; WADSACK, C. Serine Hydrolases in Lipid Homeostasis of the Placenta-Targets for Placental Function? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 12, p. 6851–6851, 20 jun. 2022.

Botany online: History of discovery - spermatozoids - *Ginkgo biloba* - *Cycas revoluta*. Disponível em: <<https://web.archive.org/web/20150926052738/http://www1.biologie.uni-hamburg.de/b-online/fo47/ginkgo/ogura.htm>>.

BOWLES, A. M. C. et al. The origin and early evolution of plants. **Trends in Plant Science**, out. 2022.

BRAUNS, A.-K. et al. A defect in the peroxisomal biogenesis in germ cells induces a spermatogenic arrest at the round spermatid stage in mice. **Sci Rep** **9**, n. 1, 2 jul. 2019.

BROHMANN, H.; PINNECKE, S.; HOYER-FENDER, S. Identification and Characterization of New cDNAs Encoding Outer Dense Fiber Proteins of Rat Sperm. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 15, p. 10327–10332, abr. 1997.

BUCCHINI, F., Del Cortona, A., Kreft, Ł., Botzki, A., Van Bel, M., & Vandepoele, K. (2021). TRAPID 2.0: a web application for taxonomic and functional analysis of *de novo* transcriptomes. **Nucleic Acids Research**, 49(17), e101-e101.

BUD31 BUD31 homolog [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8896#summary>>. Acesso em: 27 fev. 2024.

CAREY, S. B. et al. Gene-rich UV sex chromosomes harbor conserved regulators of sexual development. **Science Advances**, v. 7, n. 27, 2 jul. 2021.

CHARLESWORTH, D. The mysterious sex chromosomes of haploid plants. **Heredity**, v. 129, n. 1, p. 17–21, 7 abr. 2022.

CRISP, M.; COOK, L. Do early branching lineages signify ancestral traits? **Trends in Ecology & Evolution**, v. 20, n. 3, p. 122–128, mar. 2005

CUI, X. et al. Young Genes out of the Male: An Insight from Evolutionary Age Analysis of the Pollen Transcriptome. **Molecular Plant**, v. 8, n. 6, p. 935–945, jun. 2015.

DARSZON, A. et al. Ion Channels in Sperm Physiology. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 2, p. 481–510, 1 abr. 1999.

DOU, Q. et al. Selenoprotein TXNRD3 supports male fertility via the redox regulation of spermatogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 298, n. 8, p. 102183–102183, 1 ago. 2022.

DOYLE, W. T. 1970. **The Biology of Higher Cryptogams**: 163 pp. Macmillan, New York.

Functional domains and temperature-sensitive mutations in SPE-9, an EGF repeat-containing protein required for fertility in *Caenorhabditis elegans*. **Developmental Biology**, v. 272, n. 2, p. 448–459, 15 ago. 2004.

FERNANDEZ-POZO, N. et al. An overview of bioinformatics, genomics, and transcriptomics resources for bryophytes. **Journal of Experimental Botany**, v. 73, n. 13, p. 4291–4305, 11 fev. 2022.

GALINDO-GONZÁLEZ, L. et al. Ty1-copia elements reveal diverse insertion sites linked to polymorphisms among flax (*Linum usitatissimum* L.) accessions. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, dez. 2016.

GARD, D. L. Microtubule organization during maturation of *Xenopus oocytes*: Assembly and rotation of the meiotic spindles. **Developmental Biology**, v. 151, n. 2, p. 516–530, jun. 1992.

GITZENDANNER, M. A. et al. Plastid phylogenomic analysis of green plants: A billion years of evolutionary history. **American Journal of Botany**, v. 105, n. 3, p. 291–301, mar. 2018.

GOFFINET, B. **Bryophyte Biology**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2008.

GREENBAUM, E.; CARR, J. L. Sexual differentiation in the spiny softshell turtle (*Apalone spinifera*), a species with genetic sex determination. **Journal of Experimental Zoology**, v. 290, n. 2, p. 190–200, 2001.

HEALEY, A. L. et al. Newly identified sex chromosomes in the *Sphagnum* (peat moss) genome alter carbon sequestration and ecosystem dynamics. **Nature Plants**, v. 9, n. 2, p. 238–254, 1 fev. 2023.

HOLÁ, E. et al. Sex ratio, sex-specific pattern in vegetative growth and gemma production in an aquatic liverwort, *Scapania undulata* (Marchantiophyta: Scapaniaceae): SEXUAL AND ASEXUAL REPRODUCTION IN SCAPANIA. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 175, n. 2, p. 229–241, jun. 2014

HORST, N. A. et al. A single homeobox gene triggers phase transition, embryogenesis and asexual reproduction. **Nature Plants**, v. 2, n. 2, p. 15209, 18 jan. 2016.

HUANG, V. W. et al. Sperm fucosyltransferase-5 mediates spermatozoa–oviductal epithelial cell interaction to protect human spermatozoa from oxidative damage. **MHR: Basic science of reproductive medicine**, v. 21, n. 6, p. 516–526, 9 abr. 2015.

HUANG, Y. et al. Characterization, Genomic Organization, Abundance, and Chromosomal Distribution of Ty1-copia Retrotransposons in *Erianthus arundinaceus*. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 7 jun. 2017.

JESSON, L. K.; CAVANAGH, A. P.; PERLEY, D. S. Polyploidy influences sexual system and mating patterns in the moss *Atrichum undulatum* sensu lato. **Annals of Botany**, v. 107, n. 1, p. 135–143, 7 nov. 2010.

JU TAE SEO et al. Expression of Mucin Genes in the Human Testis and Its Relationship to Spermatogenesis. **Yonsei Medical Journal**, v. 46, n. 5, p. 667–667, 1 jan. 2005.

JULCA, I. et al. Comparative transcriptomic analysis reveals conserved programmes underpinning organogenesis and reproduction in land plants. **Nature Plants**, v. 7, n. 8, p. 1143–1159, 12 jul. 2021.

KANNAN PACHAMUTHU; BORGES, F. Epigenetic control of transposons during plant reproduction: From meiosis to hybrid seeds. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 75, p. 102419–102419, 1 out. 2023.

KAWADE, K. et al. Metabolic Control of Gametophore Shoot Formation through Arginine in the Moss *Physcomitrium patens*. **Cell Reports**, v. 32, n. 10, p. 108127, set. 2020.

KAYE, E. G. et al. RNA polymerase II pausing is essential during spermatogenesis for appropriate gene expression and completion of meiosis. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, 29 jan. 2024.

KOTI, S. Interactive effects of carbon dioxide, temperature, and ultraviolet-B radiation on soybean (*Glycine max* L.) flower and pollen morphology, pollen production, germination, and tube lengths. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 412, p. 725–736, 10 jan. 2005.

KRUG, J. C.; BENNY, G. L.; KELLER, H. W. COPROPHILOUS FUNGI. **Biodiversity of Fungi**, p. 467–499, 2004.

LANG, D. et al. Exploring plant biodiversity: the *Physcomitrella* genome and beyond. **Trends in Plant Science**, v. 13, n. 10, p. 542–549, 2008.

LEEBEN-MACK, J.H. et al. One Thousand Plant Transcriptomes Initiative. One thousand plant transcriptomes and the phylogenomics of green plants. **Nature**. 2019 Oct;574(7780):679-685.

LIU, J. et al. Genetic transformation of moss plant. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 227–232, 16 jan. 2013.

LLORENS, L. et al. The role of UV-B radiation in plant sexual reproduction. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 17, n. 3, p. 243–254, maio 2015.

MEYBERG, R. et al. Characterisation of evolutionarily conserved key players affecting eukaryotic flagellar motility and fertility using a moss model. **New Phytologist**, v. 227, n. 2, p. 440–454, jul. 2020.

MITCHELL, D. R. The Evolution of Eukaryotic Cilia and Flagella as Motile and Sensory Organelles. Em: Eukaryotic Membranes and Cytoskeleton. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. New York, NY: Springer New York, 2007. v. 607p. 130–140.

MORADI, M. et al. Evaluation of the p53 and Thioredoxin reductase in sperm from asthenozoospermic males in comparison to normozoospermic males. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 116, p. 123–128, 1 fev. 2018.

MORRIS, J. L. et al. The timescale of early land plant evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 10, p. E2274–E2283, 20 fev. 2018.

NENICU, A. et al. Peroxisomes in Human and Mouse Testis: Differential Expression of Peroxisomal Proteins in Germ Cells and Distinct Somatic Cell Types of the Testis1. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 6, p. 1060–1072, 1 dez. 2007.

ODF4 orthologs. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/146852/ortholog/?scope=40674>>. Acesso em: 15 nov. 2024.

OGAWA, T. et al. Molecular Characterization of Organelle-Type Nudix Hydrolases in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 148, n. 3, p. 1412–1424, 24 set. 2008.

OSBORNE, L. J. et al. Expression and localisation of thioredoxin in mouse reproductive tissues during the oestrous cycle. **Molecular Reproduction and Development**, v. 58, n. 4, p. 359–367, 2001.

- OTERO, S.; HELARIUTTA, Y.; BENITEZ-ALFONSO, Y. Symplastic communication in organ formation and tissue patterning. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 29, p. 21–28, fev. 2016.
- OVESEN, P.; FLYVBJERG, A.; ØRSKOV, H. Insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding proteins in seminal plasma before and after vasectomy in normal men. **Fertility and Sterility**, v. 63, n. 4, p. 913–918, abr. 1995.
- PARKER, C. G. et al. New cells added to the preoptic area during sex change in the common clownfish *Amphiprion ocellaris*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 333, p. 114185, mar. 2023.
- PINART, E. Ion Channels of Spermatozoa: Structure, Function, and Regulation Mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 11, p. 5880, 24 maio 2022.
- PUTTICK, M. N. et al. The Interrelationships of Land Plants and the Nature of the Ancestral Embryophyte. **Current Biology**, v. 28, n. 5, p. 733- 745.e2, mar. 2018.
- R CORE TEAM. **R: The R Project for Statistical Computing**. Disponível em: <<https://www.r-project.org>>.
- RAMSAY, H. P. and BERRIE, G. K. 1982. Sex determination in bryophytes. *J. Hattori Bot. Lab.* 52: 255-274.
- RENSING, S. A. et al. The Moss *Physcomitrium (Physcomitrella) patens*: A Model Organism for Non-Seed Plants. **The Plant Cell**, v. 32, n. 5, p. 1361–1376, 9 mar. 2020.
- RENZAGLIA, K. S.; GARBAR, D. J. Motile Gametes of Land Plants: Diversity, Development, and Evolution. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 20, n. 2, p. 107–213, mar. 2001.
- ROMANENKO, S. A. et al. Complex Structure of *Lasiopodomys mandarinus vinogradovi* Sex Chromosomes, Sex Determination, and Intraspecific Autosomal Polymorphism. **Genes**, v. 11, n. 4, p. 374–374, 30 mar. 2020.
- SANTOS, W. L. D.; PEREIRA ALVARENGA, L. D.; PÔRTO, K. C. Sexual Dimorphism, Vegetative Growth and Reproductive Investment in the Rhizautoicous Moss *Fissidens flaccidus* (Fissidentaceae, Bryopsida). **Cryptogamie, Bryologie**, v. 39, n. 2, p. 271–281, abr. 2018.
- SAUNDERS, P. A.; VEYRUNES, F. Unusual Mammalian Sex Determination Systems: A Cabinet of Curiosities. **Genes**, v. 12, n. 11, p. 1770, 8 nov. 2021.
- SHAW, J., AND RENZAGLIA, K. (2004). Phylogeny and diversification of bryophytes. **Am J Bot** 91, 1557-1581.

SHIZUE, M.; MELO, E. P. Mucin 2 (MUC2) promoter characterization: an overview. **Cell and Tissue Research**, v. 374, n. 3, p. 455–463, 14 set. 2018.

SHUKLA, E.; D. BENDRE, A.; M. GAIKWAD, S. Hydrolases: The Most Diverse Class of Enzymes. **Hydrolases**, 15 jun. 2022.

SINGSON, A.; MERCER, K. B.; L'HERNAULT, S. W. The *C. elegans* spe-9 Gene Encodes a Sperm Transmembrane Protein that Contains EGF-like Repeats and Is Required for Fertilization. **Cell**, v. 93, n. 1, p. 71–79, abr. 1998.

STEWART, K. D.; MATTOX, K. R. Comparative cytology, evolution and classification of the green algae with some consideration of the origin of other organisms with chlorophylls A and B. **The Botanical Review**, v. 41, n. 1, p. 104–135, jan. 1975.

SU, D. et al. Large-Scale Phylogenomic Analyses Reveal the Monophyly of Bryophytes and Neoproterozoic Origin of Land Plants. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 8, p. 3332–3344, 19 abr. 2021.

SUNDBERG, S.; RYDIN, H. Habitat requirements for establishment of *Sphagnum* from spores. **Journal of Ecology**, v. 90, n. 2, p. 268–278, abr. 2002.

TAYLOR, R. J. et al. (EDS.). **The Mosses of North America: an inquiry into the biology of mosses based upon a symposium sponsored by the Pacific Section, Botanical Society of America**. San Francisco, Calif: Pacific Division, American Association for the Advancement of Science, 1980.

TIMME, R. E.; BACHVAROFF, T. R.; DELWICHE, C. F. Broad Phylogenomic Sampling and the Sister Lineage of Land Plants. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. e29696, 13 jan. 2012.

UniProt. Disponível em:

<<https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A0E0JR88/entry>>. Acesso em: 05 jan. 2024.

VAN GESSEL, N., LANG, D., RESKI, R. (2017). Genetics and Genomics of *Physcomitrella patens*. In: Assmann, S., Liu, B. (eds) Plant Cell Biology. **The Plant Sciences**, vol 20. Springer, New York, NY.

WICKHAM H (2016). ggplot2: **Elegant Graphics for Data Analysis**. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>.

WU, S.-Z. et al. Myosin VIII Regulates Protonemal Patterning and Developmental Timing in the Moss *Physcomitrella patens*. **Molecular Plant**, v. 4, n. 5, p. 909–921, set. 2011.

ZAFAR, M. I.; LU, S.; LI, H. Sperm-oocyte interplay: an overview of spermatozoon's role in oocyte activation and current perspectives in diagnosis and fertility treatment. **Cell & Bioscience**, v. 11, n. 1, 6 jan. 2021.

ZIMMERMANN, M. T. The Importance of Biologic Knowledge and Gene Expression Context for Genomic Data Interpretation. **Frontiers in Genetics**, v. 9, p. 670, 18 dez. 2018.

ZHANG, M. et al. Mechanism of endometrial MUC2 in reproductive performance in mice through PI3K/AKT signaling pathway after lipopolysaccharide treatment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 231, p. 113177–113177, 1 fev. 2022.

ZHAO, W. et al. Outer dense fibers stabilize the axoneme to maintain sperm motility. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 22, n. 3, p. 1755–1768, 23 nov. 2017.