

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA  
FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS microRNAs miR319 E  
miR397 EM CANA-DE-AÇÚCAR INFECTADA POR  
*Xanthomonas albilineans***

**Thiago Mateus Rosa dos Santos**

Biotecnólogo

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA  
FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS microRNAs miR319 E  
miR397 EM CANA-DE-AÇÚCAR INFECTADA POR  
*Xanthomonas albilineans***

**Thiago Mateus Rosa dos Santos**

**Orientadora: Profa. Dra. Sonia Marli Zingaretti**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

**2017**

Santos, Thiago Mateus Rosa dos  
S237e Expressão diferencial dos microRNAs miR319 e miR397 em cana-  
de-açúcar infectada por *Xanthomonas albilineans* / Thiago Mateus  
Rosa dos Santos. -- Jaboticabal, 2017  
vii, 40 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017  
Orientadora: Sonia Marli Zingaretti  
Banca examinadora: Janete Aparecida Desiderio, Tiago Antunes  
Paz  
Bibliografia

1. Estresse biótico. 2. miRNA. 3. miR319. 4. miR397. 5. *Saccharum  
officinarum*. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e  
Veterinárias.

CDU 631.52:633.61

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS microRNAs miR319 E miR397 EM  
CANA-DE-AÇÚCAR INFECTADA POR *Xanthomonas albilineans*

AUTOR: THIAGO MATEUS ROSA DOS SANTOS

ORIENTADORA: SONIA MARLI ZINGARETTI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AGRONOMIA  
(GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. SONIA MARLI ZINGARETTI  
Departamento de Biotecnologia / UNAERP - Ribeirão Preto, SP



Pós-doutorando TIAGO ANTUNES PAZ  
Instituto de Química / UNESP - Campus Araraquara



Profa. Dra. JANETE APPARECIDA DESIDERIO  
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 03 de maio de 2017.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**Thiago Mateus Rosa dos Santos** – nascido em 11 de março de 1985 em Ribeirão Preto, SP. Graduado em Biotecnologia pela Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP – Ribeirão Preto, SP. Em agosto de 2014 ingressou no Programa de Pós-graduação em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas, nível de mestrado, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP), sob a orientação da Profa. Dra. Sonia Marli Zingaretti. O desenvolvimento da presente dissertação, foi realizado com o auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo nº 2014/19667-8 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Durante esse período participou da organização de três Cursos de Inverno em Biotecnologia, ministrando um minicurso de bioinformática na terceira edição, todos realizados na UNAERP. Realizou cursos de formação complementar nas áreas de biologia molecular, genética, bioinformática e biossegurança. Possui um artigo e resumos publicados em anais de congresso, nas áreas de biologia molecular e bioinformática. Além disso, participou de congressos e eventos na área de atuação.

*“Failure is an option here. If things are not failing, you are not innovating enough”.*

(Elon Musk)

### **Dedico**

*Ao meu pai, Deoclides de Fátima dos Santos (in memoriam) por ter sido o meu esteio e exemplo, e a minha mãe, Aparecida Antônia Rosa dos Santos por ser o meu espelho de força nos momentos difíceis que passamos.*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, pai, mãe, irmã e sobrinha simplesmente por serem a minha família.

À minha namorada Tatiana Komoto, por estar ao meu lado por tanto tempo e sem a sua ajuda esse trabalho não teria acontecido.

À minha orientadora Profa. Dra. Sonia Marli Zingaretti por ter me dado essa oportunidade, no momento em que aceitou o meu pedido de orientação. Por acompanhar momentos difíceis e comemorar momentos felizes.

Aos amigos, Thiago Paz, Érica Gelfuso, Marielle Cascaes e Érica Carvalho, pelos puxões de orelha e risadas nesses anos.

Aos colegas de pós-graduação, Cyro Bueno, Renan Silva, Janeth Pinheiro, Luana Mantovanini, Natália Takahashi, João Manechini e Vinícius Teixeira pelo aprendizado sobre a vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP), pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), pela concessão de bolsa de estudo.

À Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP por permitir a utilização das instalações e equipamentos para a realização do projeto.

À Profa. Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza, pela parceria na realização do experimento.

À colega Carolina Pani, pelo auxílio na condução inicial do experimento.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) – Centro da cana de Ribeirão Preto, pelo auxílio para a realização do projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo apoio financeiro na realização do projeto nº 2014/19667-8.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização desse projeto.



## SUMÁRIO

RESUMO .....	i
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE TABELAS .....	v
LISTA DE FIGURAS .....	vi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Cana-de-açúcar .....	3
2.2. <i>Xanthomonas albilineans</i> .....	4
2.3. Mecanismos de defesa .....	7
2.4. MicroRNAs.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. Material vegetal e bacteriano .....	12
3.2. Inoculação de <i>X. albilineans</i> em cana-de-açúcar .....	12
3.3. Coleta das amostras .....	13
3.4. Extração de RNA total.....	13
3.5. Tratamento com DNase.....	13
3.6. Obtenção das sequências dos miRNAs miR319 e miR397 .....	14
3.7. Síntese de cDNA .....	15
3.8. Análise dos miRNAs por PCR em tempo real .....	15
3.9. Predição dos alvos de miRNAs.....	17
3.10 Análise de expressão dos possíveis genes alvo .....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4.1. Predição dos genes alvos de miRNAs .....	19
4.2. Perfil de expressão do miR397 .....	19
4.3. Perfil de expressão do miR319 .....	24
4.4. Perfil de expressão dos genes <i>Lac12/13</i> e <i>GAMyB</i> , alvos do miR397 e miR319 .....	30
5. CONCLUSÃO .....	32
6. REFERÊNCIAS.....	33

## EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS microRNAs miR319 E miR397 EM CANA-DE-AÇÚCAR INFECTADA POR *Xanthomonas albilineans*

**RESUMO** - A cana-de-açúcar é acometida por uma doença conhecida por “escaldadura das folhas” causada pela bactéria colonizadora do xilema *Xanthomonas albilineans*, considerada uma das principais doenças que atingem a cultura da cana-de-açúcar. A sintomatologia na fase crônica se caracteriza, principalmente, pelo aparecimento de uma faixa branca ao lado da nervura central da folha, a qual evolui para clorose total causando a morte da planta. Uma vez que o patógeno pode ser transmitido de várias maneiras, o seu controle demanda altos custos. Desta maneira, o desenvolvimento de cultivares tolerantes é uma boa opção para o controle efetivo da doença. A tolerância e sensibilidade das plantas aos fatores bióticos está relacionada com a expressão de genes, e dentre estes, os miRNAs (incluindo o miR397 e o miR319) têm sido relatados como importantes reguladores em vários mecanismos de resposta das plantas. O objetivo deste trabalho foi analisar a expressão de dois miRNAs (miR319 e miR397) em duas cultivares de cana-de-açúcar (RB86-7515 - tolerante e SP78-4467 - suscetível), infectadas por uma linhagem de *X. albilineans* (IACXa11), considerada a mais virulenta do Brasil. Para isto, as plantas foram cultivadas em vasos, inoculadas com *X. albilineans* e mantidas em casa de vegetação. Amostras de folhas e colmos foram coletadas em cinco períodos (24, 72, 144, 360 e 720 h) e a expressão dos miRNAs foi analisada pela técnica de *Stem-loop* RT-qPCR. Os miR397 e miR319 apresentaram-se diferencialmente expressos nas cultivares e entre os tecidos. Na cultivar suscetível (SP78-4467), durante os primeiros períodos de infecção (24, 72 e 144 h), houve uma resposta tardia de defesa quando comparada com a cultivar tolerante (RB86-7515). O miR319 apresentou o mesmo perfil de expressão em folhas e colmos da cultivar RB86-7515 (tolerante), sugerindo que o reconhecimento do patógeno e a ativação dos mecanismos de defesa são modulados em ambos os tecidos. De maneira geral, as análises dos miRNAs demonstraram que a expressão do miR397 é menor quando comparada com o miR319. O mesmo padrão foi observado para os seus respectivos genes alvo. O miR397 regula a enzima lacase, importante na biossíntese de lignina. A repressão

deste miRNA aumentaria a lignificação, sugerindo um mecanismo estrutural de resposta. O miR319 regula os fatores de transcrição (FTs) MYB e TCP, os quais são responsáveis pela sinalização de ácido abscísico (ABA) e ácido jasmônico (JA). A repressão destes hormônios vegetais desencadeia a sinalização por ácido salicílico (SA), o qual é responsável pela defesa contra patógenos hemibiotróficos, tal como *X. albilineans*.

**Palavras-chave:** estresse biótico, miRNA, miR319, miR397, *Saccharum officinarum*, *Xanthomonas albilineans*

**DIFFERENTIAL EXPRESSION OF miR319 AND MIR 397 microRNAs IN  
SUGARCANE INFECTED BY *Xanthomonas albilineans***

**ABSTRACT** - Sugarcane is affected by a disease known as "leaf scald" caused by the bacterium *Xanthomonas albilineans*, which colonizes the xylem. This disease is one of the most important for sugarcane culture. The chronic phase is mainly characterized by the white band emergence along the central leaf vein, which causes total chlorosis of the leaf and plant death. Since the pathogen can be transmitted in many ways, his control demands high costs, and the development of tolerant cultivars is a good option for disease control. The plant tolerance and sensitivity to biotic factors is related to gene expression, and among these, the miRNAs (including miR397 and miR319), have been reported as important regulators in various plant response mechanisms. The aim of this work was to analyze the expression of two miRNAs (miR319 and miR397) in two sugarcane cultivars (RB86-7515 – tolerant, and SP78-4467 - susceptible), infected by a strain of *X. albilineans* (IACXa11), the most virulent in Brazil. The plants were grown in vases, inoculated with *X. albilineans* and kept in a greenhouse. Samples of leaves and stems were collected in five periods (24, 72, 144, 360, and 720 h), and the miRNA expression was analyzed by Stem-loop RT-qPCR. The miR397 and miR319 expression were different between cultivars and tissues. In the susceptible cultivar (SP78-4467), during the first infection periods (24, 72 and 144 h), there was a late defense response when compared to the tolerant cultivar (RB86-7515). The miR319 presented the same expression profile in leaves and stems of the cultivar RB86-7515 (tolerant), suggesting that the pathogen recognition and defense mechanisms activation were modulated in both tissues. In general, miRNAs analyzes demonstrated that miR397 expression is lower when compared to miR319. The same pattern was observed for their respective target genes. The miR397 is a laccase regulator, important in lignin biosynthesis. Repression of this miRNA would increase lignification, suggesting a structural mechanism of response. The miR319 regulates the transcription factors (TFs) MYB and TCP, which are responsible for the abscisic acid (ABA) and jasmonic acid (JA) signaling. The repression of these plant hormones

triggers salicylic acid (SA) signaling pathway, which is responsible for the defense against hemibiotrophic pathogens, such as *X. albilineans*.

**Keywords:** biotic stress, miRNA, miR319, miR397, *Saccharum officinarum*, *Xanthomonas albilineans*

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração dos reagentes para tratamento com DNase. ....	13
Tabela 2. Sequência dos primers utilizados nas análises de RT-qPCR e cDNA. ....	14
Tabela 3. Concentração dos reagentes para a síntese do cDNA. ....	15
Tabela 4. Concentração dos reagentes para as reações de RT-qPCR para os miRNAs e genes constitutivos.....	16
Tabela 5. Sequência dos primers usados na RT-qPCR. ....	17
Tabela 6. Possíveis genes alvo dos miR397 e miR319 encontrados em cana-de-açúcar.....	19
Tabela 7. Valores de expressão do miR397 de folhas das cultivares SP78-4467 (suscetível) e RB86-7515 (tolerante) em relação ao seu respectivo controle. O desvio padrão baseou-se na triplicata da reação. Os valores de expressão relativa foram estabelecidos pela razão entre a expressão do gene alvo e o controle, o qual foi considerado 1. ....	20
Tabela 8. Valores de expressão do miR397 em colmos das cultivares SP78-4467 (suscetível) e RB86-7515 (tolerante) em relação ao seu respectivo controle. O desvio padrão baseou-se na triplicata da reação. Os valores de expressão relativa foram estabelecidos pela razão entre a expressão do gene alvo e o controle, o qual foi considerado 1. ....	21
Tabela 9. Valores de expressão do miR319 de folhas das cultivares SP78-4467 (suscetível) e RB86-7515 (tolerante) em relação ao seu respectivo controle. O desvio padrão baseou-se na triplicata da reação. Os valores de expressão relativa foram estabelecidos pela razão entre a expressão do gene alvo e o controle, o qual foi considerado 1. ....	25
Tabela 10. Valores de expressão do miR319 em colmos nas cultivares SP78-4467 (suscetível) e RB86-7515 (tolerante) em relação ao seu respectivo controle. O desvio padrão baseou-se na triplicata da reação. Os valores de expressão relativa foram estabelecidos pela razão entre a expressão do gene alvo e o controle, o qual foi considerado 1. ....	26
Tabela 11. Valores de expressão dos possíveis genes Lac12/13 e GAMyB alvos dos miR397 e miR319 encontrados em cana-de-açúcar, avaliados nos períodos de 24 e 720 hpi. ....	31

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Perfil de expressão do miR397 nas folhas das cultivares SP78-4467 (suscetível) e RB86-7515 (tolerante) submetidas à infecção por *X. albilineans* durante os períodos de 24, 72, 144, 360 e 720 hpi, em relação às plantas controle. Os valores de expressão relativa foram estabelecidos pela razão entre a expressão do gene alvo e o controle, o qual foi considerado 1.....20
- Figura 2. Perfil de expressão do miR397 em colmos das cultivares SP78-4467 (suscetível) e RB86-7515 (tolerante) submetidas à infecção por *X. albilineans* durante os períodos de 24, 72, 144, 360 e 720 hpi, em relação às plantas controle. Os valores de expressão relativa foram estabelecidos pela razão entre a expressão do gene alvo e o controle, o qual foi considerado 1.....21
- Figura 3. Perfil de expressão do miR397 em folhas e colmos da cultivar tolerante RB86-7515 (A) e da cultivar suscetível SP78-4467 (B), submetidas à infecção por *X. albilineans* durante os períodos de 24, 72, 144, 360 e 720 hpi.....24
- Figura 4. Perfil de expressão do miR319 nas folhas das cultivares SP78-4467 (suscetível) e RB86-7515 (tolerante) submetidas à infecção por *X. albilineans* durante os períodos de 24, 72, 144, 360 e 720 hpi, em relação às plantas controle. Os valores de expressão relativa foram estabelecidos pela razão entre a expressão do gene alvo e o controle, o qual foi considerado 1.....25
- Figura 5. Perfil de expressão do miR319 em colmos das cultivares SP78-4467 (suscetível) e RB86-7515 (tolerante) submetidas à infecção por *X. albilineans* durante os períodos de 24, 72, 144, 360 e 720 hpi, em relação às plantas controle. Os valores de expressão relativa foram estabelecidos pela razão entre a expressão do gene alvo e o controle, o qual foi considerado 1.....26
- Figura 6. Perfil de expressão do miR319 em folhas e colmos da cultivar tolerante RB86-7515 (A) e da cultivar suscetível SP78-4467 (B), submetidas à infecção por *X. albilineans* durante os períodos de 24, 72, 144, 360 e 720 hpi.....29
- Figura 7. Perfil de expressão dos possíveis genes Lac12/13 e GAMyB alvos dos miRNAs miR319 e miR397 de colmos das cultivares SP78-4467 (suscetível) e RB86-7515 (tolerante) submetidas à infecção por *X. albilineans* durante os períodos de 24 e 720h, em relação às plantas controle. Os valores de expressão relativa foram

estabelecidos pela razão entre a expressão do gene alvo e o controle, o qual foi considerado 1. ....30



## 1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma planta economicamente importante devido a produção de açúcar e etanol. As cultivares utilizadas no Brasil atualmente (*Saccharum* spp.), são o resultado de um século de hibridização entre a espécie tradicional *S. officinarum* L. e a espécie selvagem *S. spontaneum*. No entanto, o rendimento da cultura de cana-de-açúcar pode ser reduzido devido à influência de fatores ambientais, tais como salinidade, seca, fungos e doenças bacterianas.

Dentre as doenças bacterianas, a escaldadura das folhas é considerada uma das principais que afeta a cultura da cana-de-açúcar, causando redução significativa na produtividade canavieira. A doença é causada pela bactéria Gram-negativa, *Xanthomonas albilineans*, que coloniza o xilema da planta e é responsável por queda na produção. A sintomatologia da escaldadura é caracterizada pelo aparecimento de uma faixa clorótica que acompanha a nervura central da folha, evoluindo para o murchamento, necrose e subsequente morte da planta.

A disseminação do patógeno ocorre principalmente de forma mecânica, através da utilização de ferramentas de colheita (facões ou colheitadeiras mecânicas) que, uma vez contaminadas pela bactéria, podem espalhar a infecção para outras touceiras. Além disso, pode ocorrer a distribuição de mudas infectadas no momento do plantio.

Influenciada por condições ambientais, as infestações, por vezes na forma latente, podem se tornar agudas e destruir culturas inteiras em poucas semanas. Assim, a prioridade para os pesquisadores e produtores é através de melhoramento genético obter cultivares com maior tolerância à doença.

O conhecimento dos genes que compõem a planta, sua regulação em resposta a diferentes fatores ambientais, e a ação dos microRNAs, pequenos RNAs não-codificantes formados por 20 - 24 nucleotídeos na regulação da expressão gênica, podem contribuir significativamente para a produção de cultivares tolerantes.

Assim, este projeto tem por objetivo identificar e validar a expressão de dois miRNAs (miR319 e miR397) em cana-de-açúcar infectada por *X. albilineans*. As respostas destes miRNAs na regulação hormonal, defesa e desenvolvimento da

planta, já foram relatados em outras espécies vegetais e até o momento, nenhum estudo foi realizado nas condições propostas neste trabalho. Com isso, os resultados deste projeto trarão importantes contribuições para o desenvolvimento da cultura da cana-de-açúcar.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) pertence à família Poaceae, uma família de plantas economicamente importantes que inclui cereais como, milho, trigo, arroz, sorgo e muitas culturas forrageiras (aveia, centeio, cevada) (VETTORE et al., 2003). É uma gramínea originária do sudeste asiático, da região central da Nova-Guiné e Indonésia, tendo como características principais a inflorescência na forma de espiga, caule dividido em colmos e as folhas com lâminas de sílica (DANIELS; ROACH, 1987). Foi introduzida no Brasil em 1553 e desenvolveu-se bem nas regiões Centro-Sul e Nordeste (PROCÓPIO et al., 2003). Atualmente, apresenta-se entre as culturas mais importantes do mundo, por ser a principal matéria-prima na produção de açúcar e biocombustível. O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar e responsável por mais da metade do açúcar produzido mundialmente.

Em termos de eficiência na produção de etanol, o Brasil domina o processo da sua obtenção a partir do sumo da cana-de-açúcar. O biocombustível é reconhecido como etanol de primeira geração (1G), porém, com a sua produção ocorre o acúmulo de bagaço da cana-de-açúcar, que por sua vez vem sendo estudado como a matéria-prima mais promissora para produção de etanol de segunda geração (2G). O maior empecilho para obtenção de etanol 2G está na alta concentração de lignina presente no bagaço, que devido a sua recalcitrância, diminui a taxa de produção. Com isso, o objetivo principal de algumas pesquisas na área, se concentra na redução segura da lignina na espécie em questão (WANG et al., 2014b).

Diante da importância do setor sucroalcooleiro para a economia nacional, além do problema energético enfrentado pelo país e o crescimento da demanda por produtos derivados da cana-de-açúcar, é inevitável uma expansão do setor. Conforme os dados obtidos para a safra de 2016/17, estima-se uma produção de 694,54 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, 4,4% superior em relação à safra passada. Além disso, houve um aumento de 5,3% (456,1 mil hectares) de área colhida, em comparação com a safra de 2015/16, totalizando 9,1 milhões de hectares plantados (CONAB, 2015).

Para suprir as estimativas de produção, algumas medidas de controle precisam ser tomadas, uma vez que diversos fatores podem afetar o desenvolvimento da cana-de-açúcar e conseqüentemente, levar a uma queda na produção. Dentre estes fatores, o estresse abiótico, com ênfase para o estresse hídrico, é considerado o principal fator externo, que compromete o rendimento e a produtividade da cultura. Porém, estes fatores estão diretamente relacionados ao estresse biótico, criando condições favoráveis para o ataque de pragas e doenças, resultando em maiores danos econômicos. O controle de pragas e doenças acarreta no aumento expressivo dos custos de produção, sendo necessário o uso de agrotóxicos e outras medidas de prevenção nem sempre eficientes.

## **2.2. *Xanthomonas albilineans***

O gênero *Xanthomonas* (do Grego: *xanthos* = amarelo e *monas* = entidade) possui 27 espécies responsáveis pela infecção de mais de um hospedeiro. Cada espécie possui sua especificidade, tanto pelos hospedeiros, quanto pelo local de desenvolvimento, podendo ser o xilema ou os espaços intercelulares de outros tecidos (VAN DEN MOOTER; SWINGS, 1990; RYAN et al., 2011; ROYER et al., 2013). Já foram relatadas infecções em 124 monocotiledôneas entre elas o arroz, a cana-de-açúcar, banana, e 268 dicotiledôneas (citros, couve-flor, repolho, feijão, pimenta, entre outras) (LEYNS et al., 1984; VAN DEN MOOTER; SWINGS, 1990; PIERETTI et al., 2012).

Dentre as 216 doenças conhecidas que acometem mundialmente a cana-de-açúcar, 58 são encontradas no Brasil. A doença conhecida como escaldadura das folhas está entre as dez principais (ROSSETTO; SANTIAGO, [s.d.]) e tem como agente causal a bactéria *Xanthomonas albilineans* (ROTT et al., 2000). Esta bactéria Gram-negativa pertence ao filo *Proteobacteria*, a família *Xanthomonadaceae* e ocupam diversos nichos ecológicos, distribuídos mundialmente em regiões tropicais e sub-tropicais (PIERETTI et al., 2012).

*X. albilineans* é um patógeno sistêmico que invade preferencialmente o xilema da planta. Para isso, *X. albilineans* sintetiza enzimas que degradam a parede celular, auxiliando o avanço da bactéria pelo xilema. Estas enzimas também promovem o

rompimento da membrana, facilitando a propagação bacteriana, sendo consideradas importantes fatores de virulência (ROPER et al., 2007; CHATTERJEE; ALMEIDA; LINDOW, 2008; PÉREZ-DONOSO et al., 2010; PIERETTI et al., 2012). Porém, em comparação com outras espécies de *Xanthomonas* sp., *X. albilineans* difere das demais nos mecanismos patogênicos, ecológicos e taxonômicos. A bactéria *X. albilineans* não possui alguns genes que sintetizam os mecanismos HRP (*hypersensitive response and pathogenicity*), T3SS (*type III secretion system*) e T6SS (*type IV secretion system*), que estão relacionados com a capacidade do patógeno inocular proteínas efetoras, modulando a fisiologia e imunidade da planta. Além disso, também não são encontrados no genoma desta espécie, *clusters* de genes que sintetizam goma xantana, um polissacarídeo que pode estar envolvido com a formação de película ou biofilme e favorecem a sobrevivência epífita da bactéria em folhas de cana-de-açúcar (PIERETTI et al., 2009, 2015; ROYER et al., 2013). No entanto, ela possui a capacidade de produzir albicidina, um composto responsável pela formação das estrias brancas características da doença (PIERETTI et al., 2015). A albicidina é um peptídeo não-ribossomal com propriedades fitotóxicas e antibióticas com capacidade de inibição da DNA girase cloroplasmática, bloqueando a diferenciação dos cloroplastos e resultando no principal sintoma da doença (BIRCH, 2001; HASHIMI et al., 2007).

Entretanto, embora a bactéria não possua esses genes importantes para a sua sobrevivência, crescimento e propagação no interior do hospedeiro, *X. albilineans* consegue se dissipar pela planta, sugerindo a existência de outras estratégias capazes de minimizar a resposta imune do hospedeiro (BIRCH, 2001; FINKING; MARAHIEL, 2004; HASHIMI et al., 2007; MENSI et al., 2014).

A doença escaldadura das folhas pode ser caracterizada por três fases: crônica, aguda e latente, as quais podem ocorrer em sequência ou não. Na fase crônica, a doença se manifesta como uma faixa branca estreita de 1-2 mm de largura, bem definida, seguindo paralelamente a nervura central na folha (LEGAZ et al., 2011), evoluindo para murcha e necrose das folhas infectadas, levando a planta à morte. Em alguns casos, observa-se o desenvolvimento anormal de brotos laterais em hastes e brotos laterais basais cujo desenvolvimento é mais rápido que os superiores (RICAUD; RYAN, 1989; ROTT et al., 2000). Na fase aguda, os sintomas são

acentuados, com a estria mais larga, se estendendo até a bainha e o limbo foliar, ocasionando clorose total ou parcial, murcha e morte rápida da planta (ZHANG; BIRCH, 1997). Outros sintomas podem ser internos, tais como estrias vasculares vermelhas devido à necrose dos vasos, cavidades nos colmos, nanismo e crescimento lateral dos entrenós em cultivares suscetíveis (BIRCH, 2001).

A forma latente por sua vez, é impossível de ser reconhecida no campo, pois a planta não apresenta sintomas visíveis, mesmo em cultivares suscetíveis. A latência pode ocorrer independentemente do tamanho da população bacteriana, permanecendo por longos períodos. Influenciada pelas condições ambientais, estas infestações latentes podem se tornar agudas, destruindo culturas inteiras em poucas semanas, provocando surtos como já ocorreu entre as décadas de 80 e 90 (ALVAREZ; SCHENCK; BENEDICT, 1996; JAUFEERALLY-FAKIM et al., 2000). A transição da fase latente para a aguda geralmente está associada ao estresse abiótico, principalmente o hídrico (RICAUD; RYAN, 1989). No caso das soqueiras por exemplo, a existência da doença pode levar a ocorrência de grandes falhas no plantio em épocas secas (TOKESHI, 2005).

A disseminação do patógeno ocorre principalmente de forma mecânica, por meio da utilização de ferramentas de colheita como facões ou colheitadeiras mecânicas. Uma vez em contato com o sumo contaminado, a bactéria pode ser transferida para outras touceiras. Outras formas de transmissão ocorrem via aérea, pelo contato, gutação (BIRCH, 2001) e sobrevivência epífita, facilitando a colonização do xilema (DAUGROIS et al., 2003; CHAMPOISEAU; ROTT; DAUGROIS, 2009). Além disso, pode ocorrer a distribuição de mudas infectadas no momento do plantio (RICAUD; RYAN, 1989; ROTT et al., 2000).

A cana-de-açúcar é a principal hospedeira de *X. albilineans*, porém a bactéria pode acometer outras espécies da família Poaceae (PIERETTI et al., 2009), como milho, *Brachiaria piligera*, *Imperata cylindrica*, *Paspalum spp.*, *Rottboellia cochinchinensis*. Particularmente, o patógeno pode persistir em *Imperata cylindrica* por longos períodos, transformando-a em uma importante fonte de inóculo, o mesmo ocorre para culturas de milho ou próximas a plantios de cana-de-açúcar, facilitando a transmissão cruzada (RICAUD; RYAN, 1989; BIRCH, 2001).

Apesar da doença estar presente desde 1943 no Brasil, causar alto impacto na produção da cana-de-açúcar e ocorrer em pelo menos 66 países ao redor do mundo (ROTT et al., 2000), sua importância é subestimada devido aos erros de diagnóstico e a confusão com alguns sintomas do raquitismo da soqueira, provocado pela bactéria *Leifsonia xyli subsp. Xyli* que possui inclusive, hábitos muito próximos de *X. albilineans* (CASAGRANDE; SANGUINO; FERREZINI, 1997; PIERETTI et al., 2012). Vários métodos foram desenvolvidos com o objetivo de diagnosticar a doença com mais facilidade e exatidão, incluindo métodos sorológicos, tais como: microaglutinação, ELISA e pela técnica de PCR. Porém, não demonstraram muita eficiência ou praticidade (LOPES; DAMANN, 1997).

Devido a isso, até o momento, não existem produtos químicos ou biológicos que combatam a doença satisfatoriamente. A forma de controle principal é pela troca de cultivares suscetíveis por cultivares tolerantes. Outras formas de controle, não menos importante, exigem o devido cuidado de cultivar mudas saudáveis em viveiros assépticos e a desinfecção de equipamentos de corte, acarretando aumento de custo e tempo em determinadas fases de desenvolvimento da cultura. Mesmo cultivares com características de produção promissoras, são descartadas dos programas de melhoramento, durante a seleção se apresentarem sinais de suscetibilidade ao patógeno. O desenvolvimento de cultivares tolerantes se mostra de extrema importância, mas a interação planta-patógeno é extremamente equilibrada e por isso faz-se necessário entender melhor os mecanismos de defesa da planta (BIRCH, 2001; DABBAS et al., 2006).

### **2.3. Mecanismos de defesa**

As plantas estão expostas a diversos fatores abióticos, entre eles variação de temperatura, umidade, radiação solar e bióticos como o ataque por fungos, nematoides, bactérias, vírus e insetos. Por serem sésseis, as plantas aperfeiçoaram seu mecanismo de defesa ao longo da evolução. Em relação ao estresse biótico, a defesa pode ser constitutiva, sendo particular de cada genótipo, no qual os compostos químicos e estruturas morfológicas presentes na planta dificultarão o acesso de agentes patogênicos. Esta defesa também pode ser considerada induzida quando

qualquer alteração morfológica ou hormonal se inicia apenas como resultado de estresse e a resistência sistêmica induzida (ISR) é uma estratégia que possui grande interesse biotecnológico, a fim de desenvolver plantas com tolerância ao estresse biótico (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000; VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006; SOUZA; DIAS; SILVA-FILHO, 2017).

A interação entre planta e patógeno pode ser classificada de duas maneiras: compatível e incompatível. No sistema compatível, o patógeno por meio da produção de compostos (toxinas, enzimas extracelulares, entre outros) enfraquece ou suprime o sistema de defesa do hospedeiro e se estabelece em seu sítio de infecção. Na interação incompatível, o hospedeiro por meio de respostas de hipersensibilidade (HR), reconhece o invasor, desencadeando a morte de várias células no local da infecção, ocasionando necroses localizadas e conseqüentemente, eliminando o patógeno. O sistema de interação incompatível é utilizado por cultivares vegetais tolerantes ou cultivares que não são hospedeiras naturais do patógeno (DIXON; HARRISON; LAMB, 1994).

A ativação dos mecanismos de defesa do hospedeiro, tais como, HR (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1996), lignificação da parede celular, síntese e acúmulo de fitoalexinas (GUSTINE, 1990), síntese de proteínas antimicrobianas *Pathogenesis Related* (PR), geração de espécies reativas de oxigênio (DIXON; HARRISON; LAMB, 1994) e enzimas hidrolíticas (DANGL, 1994), necessitará do reconhecimento e indução de respostas, os quais podem ser rápidos, em cultivares tolerantes, ou lentos, em cultivares suscetíveis (YANG; SHAH; KLESSIG, 1997; KELLER, 1999; CHE et al., 2002).

Ao longo de sua evolução, as plantas têm desenvolvido respostas adaptativas envolvendo alterações nos níveis de expressão gênica. Os genes serão induzidos ou reprimidos em resposta às alterações ambientais. Uma das mais recentes descobertas relacionadas com a regulação gênica são os microRNAs (miRNAs), considerados importantes fatores envolvidos na resposta ao estresse em plantas (VOINNET, 2009).



## 2.4. MicroRNAs

Os miRNAs são uma classe extensa de pequenos RNAs não-codificantes, formados por 20 - 24 nucleotídeos, que desempenham a função de reprimir a expressão de genes através da clivagem do mRNA alvo e como consequência promovem o silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS). Os miRNAs controlam a expressão de genes fundamentais ao desenvolvimento e funções biológicas dos organismos vivos, incluindo controle hormonal, respostas imunes e adaptação ao estresse biótico e abiótico (SUNKAR et al., 2007; PEDERSEN; DAVID, 2008; VOINNET, 2008). Cerca de 8.500 sequências de miRNAs vegetais estão depositadas no miRBase (KOZOMARA; GRIFFITHS-JONES, 2014).

Desde a descoberta dos miRNAs, diversos estudos foram realizados associando a expressão gênica destes com diferentes tipos de estresse em cana-de-açúcar (ZANCA et al., 2010; ZHANG et al., 2011a; FERREIRA et al., 2012; THIEBAUT et al., 2012a, 2012b; CARNAVALE BOTTINO et al., 2013; SHEN et al., 2014). Análises experimentais e computacionais têm demonstrado que a maioria dos prováveis alvos regulados pelos miRNAs são fatores de transcrição (TF) e possuem alta homologia com os encontrados em *Arabidopsis* sp., sugerindo que podem ser altamente conservados entre mono e dicotiledôneas (BONNET et al., 2004; WANG et al., 2004a, 2004b; SHEN et al., 2014).

Navarro et al. (2006) demonstraram que em *Arabidopsis thaliana* a família do miR393, na presença de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, regula a expressão de genes relacionados ao grupo hormonal das auxinas, impedindo o desenvolvimento do patógeno. Entretanto, outros miRNAs encontrados em plantas estão relacionados na defesa contra bactérias. O miR160, miR167 e miR390 foram identificados como reguladores hormonais na sinalização das auxinas. O miR159 está relacionado com a sinalização de ácido absísico (ABA) e o miR319 na sinalização de ácido jasmônico (JA) (FAHLGREN et al., 2007; ZHANG et al., 2011b).

Em *A. thaliana*, o miR319 regula os fatores de transcrição da família TCP (TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA, e PCF) que atua diretamente na expressão dos genes lipoxigenase 2 (*LOX2*), as quais são responsáveis por codificar uma enzima lipoxigenase de cloroplasto relacionada com o acúmulo de JA (BANNENBERG et al., 2009; ZHANG et al., 2011b).

O ácido salicílico (SA) é sinalizado em resposta a patógenos biotróficos e o JA, por sua vez, possui uma via de sinalização antagônica ao SA e está associado com a defesa contra patógenos necrotróficos. (GLAZEBROOK, 2005; LEON-REYES et al., 2010). O miR319 interfere no equilíbrio hormonal, suprimindo a biossíntese de JA e promovendo a defesa mediada por SA (ZHANG et al., 2011b). Esta fina regulação entre hormônios vegetais favorece a defesa induzida (TURNER; ELLIS; DEVOTO, 2002).

Outro microRNA, nomeado miR397, foi identificado como regulador de lacase em *A. thaliana* (ABDEL-GHANY; PILON, 2008). A lacase é uma oxidase composta por 4 glicoproteínas de cobre e constituem uma família de multi-genes em plantas. Estas enzimas estão envolvidas na regulação de cobre, que apresenta efeito antibacteriano e por este motivo, é muito utilizado na agricultura (BORKOW; GABBAY, 2004; YUAN et al., 2010).

As lacases também desempenham um papel importante na síntese de lignina (RANOCHA et al., 2002). O aumento na biossíntese de lignina nas plantas dificulta a ação de enzimas líticas secretadas pelo patógeno, e além disso, os seus precursores são tóxicos para o agente causal da doença (HAMMERSCHMIDT; KUĆ, 1982; KOVÁTS; BINDER; HOHL, 1991).

Inúmeros miRNAs envolvidos na resposta de defesa da mandioca (*Manihot esculenta*) quando acometida por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* foram identificados. Dentre estes, as famílias miR319 e miR397 foram relatadas como atuantes nos mecanismos de defesa da planta, estando envolvidos também na regulação do cobre, de lacases e na regulação de proteínas com domínios NB-LRR [*nucleotide binding domain (NB) and a leucine rich repeat (LRR)*], responsáveis pelos mecanismos de defesa e HR (PÉREZ-QUINTERO et al., 2012).

Estas duas famílias também foram identificadas em outras espécies da família Poaceae como arroz, sorgo, milho e Fabaceae, como a soja, apontados como responsáveis por regular fatores hormonais e de desenvolvimento (XIE et al., 2005; ZHANG et al., 2009, 2011a; KULCHESKI et al., 2011).

Em cana-de-açúcar, especificamente, já foram preditos e/ou identificados aproximadamente 70 miRNAs relacionados com as respostas aos estresses bióticos, abióticos e desenvolvimento vegetal (ZANCA et al., 2010; FERREIRA et al., 2012;

THIEBAUT et al., 2012a; CARNAVALE BOTTINO et al., 2013). No entanto, até o momento, não há relatos de miRNAs envolvidos na resposta da cana-de-açúcar em função da infecção causada por *X. albilineas*.

Considerando que as análises computacionais têm demonstrado que tanto os miRNAs quanto seus alvos são altamente conservados entre os vegetais (monocotiledôneas e dicotiledôneas) (BONNET et al., 2004; WANG et al., 2004a, 2004b), analisar o papel destes miRNAs em cultivares de cana-de-açúcar tolerantes e suscetíveis a infecção causada por *X. albilineas* poderá fornecer respostas importantes no entendimento dos fatores que atuam na tolerância da planta.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material vegetal e bacteriano

Cem mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar, 50 da cultivar SP78-4467, padrão de susceptibilidade para *X. albilineans* (DABBAS et al., 2006), e 50 da cultivar RB86-7515, tolerante à *X. albilineans* e a mais plantada no Brasil, foram cultivadas em vaso e aclimatadas em casa de vegetação por 30 dias.

Bactérias da estirpe IACXa11, considerada um dos isolados mais agressivos de *X. albilineans* encontrados no Brasil (Tardiani et al., 2014), foram utilizadas para infecção das plantas de cana-de-açúcar. O crescimento do microrganismo foi cultivado em meio de cultura seletivo XAS - (*Xanthomonas albilineans* *Selective Medium*) (Davis, 1994) e mantido em 28 °C, conforme descrito por Silva; Bedendo; Casagrande, (2007).

Tanto as mudas de plantas, quanto a estirpe bacteriana, foram cedidos pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) - Centro da Cana - Ribeirão Preto - São Paulo.

#### 3.2. Inoculação de *X. albilineans* em cana-de-açúcar

Vinte e cinco plantas de cada cultivar (SP78-4467 e RB 86-7515), produzidas *in vitro*, com cinco meses de idade, após serem transferidas para casa de vegetação, foram inoculadas com 100 µL de suspensão bacteriana de *X. albilineans* ( $10^8$  Unidades Formadoras de Colônia/mL, UFC/mL). A concentração dos microrganismos foi ajustada utilizando-se tampão PBS e espectrofotômetro (OD600 = 0,4). A inoculação foi realizada utilizando-se a técnica de decapitação (MENSI et al., 2014). As plantas dos grupos controle (25 plantas) foram inoculadas utilizando apenas tampão PBS (100 µL) estéril.

Os experimentos de infecção foram realizados no IAC, sob supervisão da Profa. Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza e auxílio da Msc. Carolina de Cássia Pani Medeiros.

### 3.3. Coleta das amostras

Amostras de folhas e colmos das cultivares SP78-4467 e RB 86-7515, das plantas infectadas e controles, foram coletadas nos respectivos períodos: T1 = 24 h, T2 = 72 h, T3 = 144 h, T4 = 360 h e T5 = 720 h. Para cada tratamento (horas pós infecção), foram coletadas 5 amostras, totalizando 25 análises por órgão e cultivar. Imediatamente após a coleta os tecidos foram fragmentados ( $\approx 4$  cm), congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer  $-80$  °C até seu processamento.

### 3.4. Extração de RNA total

Os RNAs totais de folhas e colmos de ambas as cultivares foram extraídos a partir de 200 mg de tecido vegetal utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. Quantidades iguais de material das 5 amostras coletadas em cada tempo foram agrupadas, formando um único lote para a extração do RNA total. Após a extração, o RNA total foi quantificado em Nano Photometer P360 (Implen) e sua qualidade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose desnaturante.

### 3.5. Tratamento com DNase

Após a avaliação da integridade do RNA, todas as amostras foram tratadas com DNase I (Sigma Aldrich), conforme recomendação do fabricante. A quantidade dos reagentes assim como a sua concentração estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração dos reagentes para tratamento com DNase.

Reagente	Quantidade
RNA total	1 $\mu$ g
DNase I (1 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ L
10X Reaction Buffer	1 $\mu$ L
Água q.s.p	-
<b>Volume Final</b>	<b>11 <math>\mu</math>L</b>

Após 15 min de incubação do RNA total e reagentes em temperatura ambiente, foram adicionados em cada amostra 1 µl de Stop Solution (50 mM EDTA), que em seguida foram incubadas à 70 °C por 10 min. Ao final, o resultado da reação foi utilizado para síntese de cDNA.

### 3.6. Obtenção das sequências dos miRNAs miR319 e miR397

Sete sequências do miR397 e dez sequências do miR319, específicos de cana-de-açúcar, foram obtidas na literatura (FERREIRA et al., 2012; THIEBAUT et al., 2012b, 2014; CARNAVALE BOTTINO et al., 2013; GENTILE et al., 2013; ORTIZ-MOREA et al., 2013). As sequências de cada miRNA foram alinhadas entre si utilizando o software ClustalX versão 2.1 (LARKIN et al., 2007). Posteriormente, as sequências de cana-de-açúcar que possuíam maior similaridade entre si, foram alinhadas com as sequências dos respectivos miRNAs encontrados em sorgo e arroz. As sequências de miRNAs de sorgo e arroz foram obtidas a partir do banco de dados miRBase release 21. As sequências dos miRNAs selecionadas foram: miR319 – TTGGACTGAAGGGTGCTCCCT e miR397 – TTGAGTGCAGCGTTGATGAGC. As sequências dos *primers* utilizados na síntese de cDNA e análises por RT-qPCR estão descritas na Tabela 2. As sequências dos *primers* constitutivos  $\alpha$ -Tub e GAPDH foram obtidas na literatura (THIEBAUT et al., 2012b; SILVA et al., 2014). As sequências dos *primers* para cada miRNA foram desenhadas baseado no método descrito por Varkonyi-Gasic; Hellens (2011), para análise de miRNAs por RT-qPCR.

Tabela 2. Sequência dos primers utilizados nas análises de RT-qPCR e cDNA.

Gene	Sequência do <i>primer</i> (5' – 3')
miR397	F: CGGCGGTTGAGTGCAGCGTTG
	RT: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGCTCAT
miR319	F: GCGGCGTTGGAAGGGT
	RT: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAGGGAGC
Univ.	R: GTGCAGGGTCCGAGGT
$\alpha$ -Tub.	F: CCATTGGCAAGGAGATTGTT
	R: TCCACCAACTGCATTGAAGA
GAPDH	F: CACGGCCACTGGAAGCA
	R: TCCTCAGGGTTCCTGATGCC

### 3.7. Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado utilizando-se o Kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific), conforme descrito pelo fabricante, com poucas modificações. Para cada 1 µg de RNA total tratado com DNase, foram adicionados os reagentes conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Concentração dos reagentes para a síntese do cDNA.

Reagente	Volume (µL)
Oligo (dT) Primer (100 µM)	1
5X Reation Buffer	4
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL)	1
dNTP Mix (10 mM)	2
RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL)	1
Primer RT do miR397 (1 µM)	1
Primer RT do miR319 (1 µM)	1
<b>Volume Final</b>	<b>22</b>

As reações foram incubadas em termociclador a 42 °C por 60 min, seguido por 70 °C por 5 min e armazenadas à -20 °C.

Na mesma reação de síntese foram utilizados mais de um *primer* RT, resultando em reações com volume final de 22 µL. Essa modificação na síntese de cDNA foi baseada no método descrito por Varkonyi-Gasic; Hellens (2011) para análise de miRNAs por RT-qPCR e a sequência dos *primers* RT utilizados estão descritas na Tabela 2.

### 3.8. Análise dos miRNAs por PCR em tempo real

O perfil de expressão dos miRNAs foi analisado por meio da técnica de RT-qPCR utilizando *primer forward* específico para cada miRNA e um *primer reverse* universal, comum para todos os miRNAs. Todas as reações foram realizadas em triplicatas utilizando o kit SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix (Sigma Aldrich).

Como controle positivo e normalizador da reação, foram utilizados os genes constitutivos GAPDH e  $\alpha$ -Tub. Reações sem a inclusão de cDNA foram utilizadas como controle negativo. Todas as reações estão descritas na Tabela 4 e a sequência dos *primers* utilizados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 4. Concentração dos reagentes para as reações de RT-qPCR para os miRNAs e genes constitutivos.

Reagente	miRNAs ( $\mu$ L)	GAPDH ( $\mu$ L)	$\alpha$ -Tub. ( $\mu$ L)
2X JumpStart <i>Taq</i> ReadyMix	12,5	12,5	12,5
Reference Dye	0,25	0,25	0,25
<i>Primer</i> F (10 $\mu$ M)	1,0	0,5	0,7
<i>Primer</i> R (10 $\mu$ M)	1,0	0,5	0,7
cDNA	1,0	1,0	1,0
Água q.s.p	9,25	10,25	9,85
<b>Volume Final</b>	<b>25</b>	<b>25</b>	<b>25</b>

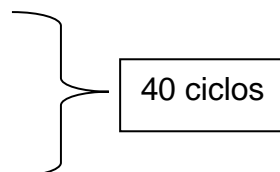
Os parâmetros de ciclagem utilizados nas análises por RT-qPCR foram:

1° ciclo: 94°C – 2 minutos;

2° ciclo: 94°C – 15 segundos;

3° ciclo: 60°C – 1 minuto;

4° ciclo: 72°C – 30 segundos;



No 5° ciclo da reação foi construída uma curva de dissociação baseada em: 95 °C - 1 minuto; 55 °C - 30 segundos e 95 °C - 30 segundos.

Os níveis de expressão dos miRNAs foram analisados utilizando o MxPro QPCR Software versão 4.10 (Stratagene) e os valores de expressão relativa foram estabelecidos pela razão entre a expressão do gene alvo e o controle, que foi considerado 1.



### 3.9. Predição dos alvos de miRNAs

Utilizando ferramentas de bioinformática, foram identificados os prováveis mRNAs alvos dos miRNAs miR319 e miR397 em cana-de-açúcar. Utilizando as plataformas *Web MicroRNA designer* (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>) e *psRNATarget* (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>) foi realizada uma busca em diferentes bancos de dados dos mRNAs de cana-de-açúcar complementares a sequência dos miRNAs. Cada gene encontrado foi comparado com o banco SUCEST (<http://sucest-fun.org/>), específico para cana-de-açúcar. Todas as sequências foram alinhadas com o auxílio da ferramenta ClustalX e as sequências dos genes candidatos com maior probabilidade de acerto foram comparadas utilizando a ferramenta Blastx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### 3.10 Análise de expressão dos possíveis genes alvo

O perfil de expressão dos genes GAMyB e Lac12/13, selecionados como possíveis alvos regulados pelos miR319 e miR397, respectivamente, foram determinados por RT-qPCR. Como controle positivo e normalizador da reação, foram utilizados os genes constitutivos GAPDH e  $\alpha$ -Tub. Reações sem a inclusão de cDNA foram utilizadas como controle negativo. As sequências dos *primers* utilizadas, bem como o tamanho do *amplicon* em pares de base (bp), estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Sequência dos primers usados na RT-qPCR.

Gene	Sequência	Amplicon (bp)
GAMyB	F: 5'- CTCCCTTCACTCCAAGATACTG - 3' R: 5' - GCGATGCACACTCAGATTTTC - 3'	145
Lac12/13	F: 5' - GCTTGAGTTCGCACTTTTGC - 3' R: 5'- CGTGTATTTGAACCGGCAC - 3'	88
$\alpha$ -Tub	F: 5' - CCATTGGCAAGGAGATTGTT - 3' R: 5' - TCCACCAACTGCATTGAAGA - 3'	104
GAPDH	F: 5' - CACGGCCACTGGAAGCA - 3' R: 5' - TCCTCAGGGTTCCTGATGCC - 3'	100

Todas as reações foram realizadas em triplicata, utilizando 20 ng de cDNA, 200 nM de cada *primer* e Kapa SYBR Fast qPCR Kit Master Mix (2X) Universal (Kapa Biosystems).

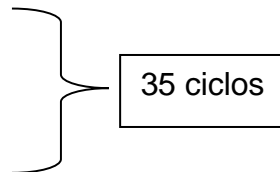
Os parâmetros de ciclagem utilizados nas análises por RT-qPCR foram:

1° ciclo: 95°C – 3 minutos;

2° ciclo: 95°C – 15 segundos;

3° ciclo: 60°C – 30 segundos;

4° ciclo: 72°C – 30 segundos;



No 5° ciclo da reação foi construída uma curva de dissociação baseada em: 95 °C - 1 minuto; 55 °C - 30 segundos e 95 °C - 30 segundos.

Os níveis de expressão dos possíveis genes alvos foram analisados utilizando o MxPro QPCR Software versão 4.10 (Stratagene) e os valores de expressão relativa foram estabelecidos pela razão entre a expressão do gene alvo e o controle que foi considerado 1.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Predição dos genes alvos de miRNAs

Dentre todas as sequências obtidas a partir da busca feita nas plataformas *Web MicroRNA designer* e *psRNATarget*, foram selecionados dois possíveis genes alvos para cada miRNA (Tabela 6). Essa seleção foi realizada seguindo alguns critérios, tais como, a energia necessária para quebrar estruturas secundárias, o pareamento completo dos nucleotídeos (nt) 10 e 12 do miRNA e da sequência alvo e o número de *mismatch* em todos os resultados.

Tabela 6. Possíveis genes alvo dos miR397 e miR319 encontrados em cana-de-açúcar.

	<b>Código de acesso</b>	<b>EST SUCEST</b>	<b>Descrição</b>
miR397	TC142804	SCRLAD1044E11.g	Laccase-12/13
	CA183151	SCMCST3168E02.g	Laccase-4
miR319	TC94752	SCJLFL3012A02.g	GAMyb
	TC63409	SCCCRT3001G03.g	PCF6

O miR397 foi identificado como possível modulador de lacases, que são enzimas envolvidas na regulação do cobre, síntese de lignina e proteínas com domínios NB-LRR, responsáveis pelos mecanismos de defesa e respostas de hipersensibilidade (ABDEL-GHANY; PILON, 2008). O miR319, provavelmente, modula fatores de transcrição GAMyB e TCP, que são responsáveis por regularem fitohormônios de crescimento e defesa (BANNENBERG et al., 2009; ZHANG et al., 2011b).

Encontrar os genes alvos de cada miRNA é fundamental para elucidar o PTGS e a atuação de cada miRNA no organismo em estudo.

### 4.2. Perfil de expressão do miR397

Analisando-se a expressão relativa do miR397 nas folhas da cultivar SP78-4467 (suscetível) infectadas por *X. albilineans*, verificou-se uma repressão inicial em

24 horas após a infecção (hpi) e a indução máxima (137%) em 72 hpi. Nos demais períodos, os valores se mantiveram induzidos, porém próximos aos das plantas controle, principalmente após o período de 720 hpi. Contrastando com os resultados observados para a cultivar suscetível, se observou na cultivar RB86-7515 (tolerante) que o miR397 apresentou variações nos níveis de indução e repressão entre os períodos, com uma baixa indução em 24 hpi (34%) e repressão após 72 hpi. A indução máxima ocorreu em 144 hpi (87%, cultivar RB86-7515) e a repressão máxima em 360 hpi. Foi observada uma nova indução em 720 hpi (Figura 1 e Tabela 7).

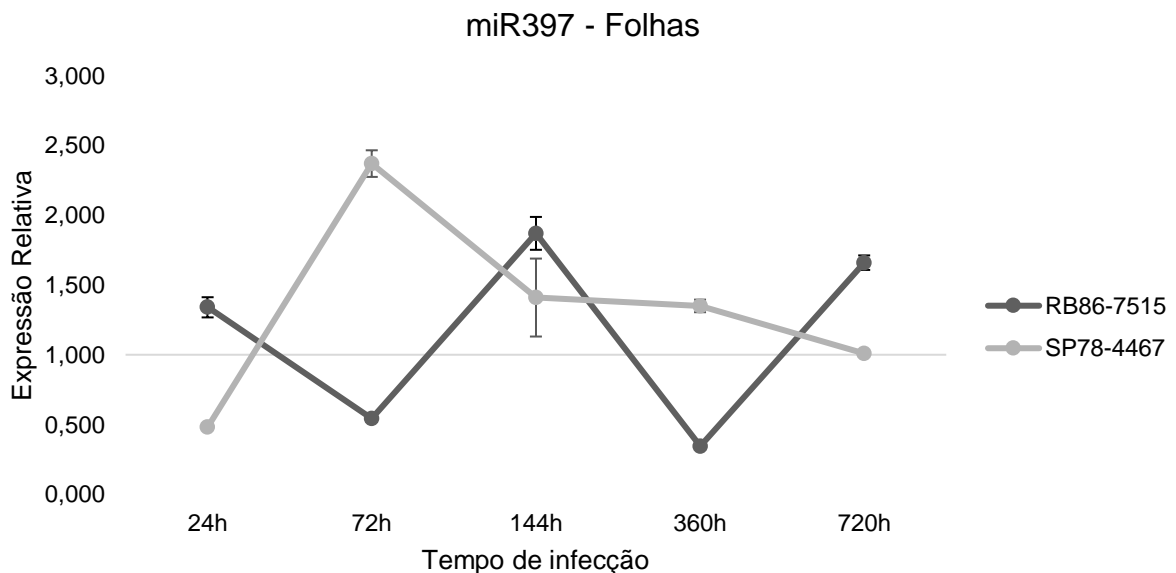


Figura 1. Perfil de expressão do miR397 nas folhas das cultivares SP78-4467 (suscetível) e RB86-7515 (tolerante) submetidas à infecção por *X. albilineans* durante os períodos de 24, 72, 144, 360 e 720 hpi, em relação às plantas controle. Os valores de expressão relativa foram estabelecidos pela razão entre a expressão do gene alvo e o controle, o qual foi considerado 1.

Tabela 7. Valores de expressão do miR397 de folhas das cultivares SP78-4467 (suscetível) e RB86-7515 (tolerante) em relação ao seu respectivo controle. O desvio padrão baseou-se na triplicata da reação. Os valores de expressão relativa foram estabelecidos pela razão entre a expressão do gene alvo e o controle, o qual foi considerado 1.

Cultivares	Tempo de infecção				
	24 h	72 h	144 h	360 h	720 h
RB86-7515	1,340 ± 0,0723	0,543 ± 0,0229	1,870 ± 0,1179	0,345 ± 0,0015	1,660 ± 0,0520
SP78-4467	0,481 ± 0,0100	2,370 ± 0,0954	1,410 ± 0,2793	1,350 ± 0,0451	1,010 ± 0,0105

Nos colmos, o miR397 também foi diferencialmente expresso em ambas as cultivares. Na cultivar SP78-4467, o miR397 foi induzido nos 3 primeiros períodos (24, 72 e 144 hpi) e reprimido nos dois últimos, com valores próximos tanto nas induções, quanto nas repressões. Na cultivar RB86-7515 foi possível verificar novamente uma variação entre os períodos: uma pequena indução de 36% no período inicial (24 hpi), seguida por uma repressão de 80% em 72 hpi. O mesmo padrão foi observado nos dois últimos períodos (360 e 720 hpi), com uma indução de 91% e, posteriormente, uma repressão, a maior observada em todos os experimentos (Figura 2 e Tabela 8).

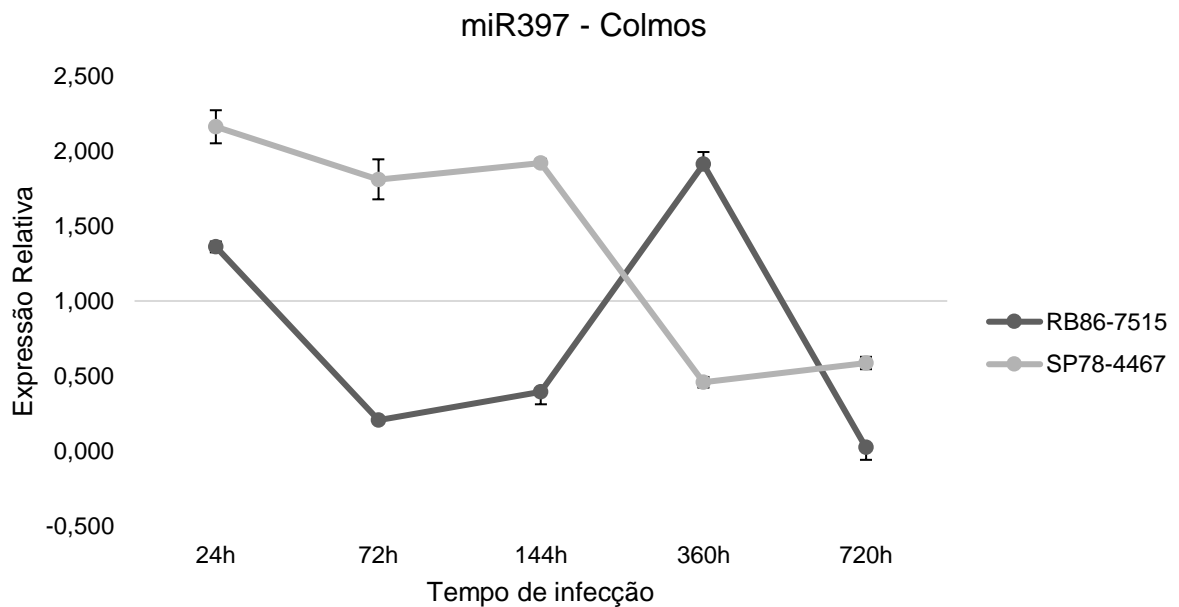


Figura 2. Perfil de expressão do miR397 em colmos das cultivares SP78-4467 (suscetível) e RB86-7515 (tolerante) submetidas à infecção por *X. albilineans* durante os períodos de 24, 72, 144, 360 e 720 hpi, em relação às plantas controle. Os valores de expressão relativa foram estabelecidos pela razão entre a expressão do gene alvo e o controle, o qual foi considerado 1.

Tabela 8. Valores de expressão do miR397 em colmos das cultivares SP78-4467 (suscetível) e RB86-7515 (tolerante) em relação ao seu respectivo controle. O desvio padrão baseou-se na triplicata da reação. Os valores de expressão relativa foram estabelecidos pela razão entre a expressão do gene alvo e o controle, o qual foi considerado 1.

Cultivares	Tempo de infecção				
	24 h	72 h	144 h	360 h	720 h
RB86-7515	1,360 ± 0,0361	0,207 ± 0,0042	0,394 ± 0,0140	1,910 ± 0,0819	0,024 ± 0,0039
SP78-4467	2,160 ± 0,1102	1,810 ± 0,1332	1,920 ± 0,0265	0,459 ± 0,0352	0,587 ± 0,0412

O miR397 é reconhecido como regulador de lacases e é altamente conservado nas plantas (JONES-RHOADES; BARTEL, 2004; ABDEL-GHANY; PILON, 2008; ZHANG et al., 2009; LI et al., 2011; KHRAIWESH; ZHU; ZHU, 2012; BARROS et al., 2015). As lacases são oxidases que participam da biossíntese de lignina, polimerizando monolignóis (estruturas de construção das ligninas), e do transporte de cobre pela célula. São extensamente distribuídas em plantas superiores por apresentarem grande importância para o sistema vascular (WANG et al., 2014a).

As lacases são sintetizadas por famílias multigênicas e assim como os miRNAs, apresentam diversas isoformas. Dezesete genes de lacases já foram descritos em *A. thaliana* e 47 genes em *Populus trichocarpa*. A sua atividade enzimática e das suas isoformas foi detectada durante a lignificação do xilema em várias espécies. Em *A. thaliana*, a lignificação do xilema só é possível pela ação de três lacases (Lac4, 11 e 17) atuando em conjunto (BERTHET et al., 2011; ZHAO et al., 2013).

Em *P. trichocarpa*, utilizando o silenciamento gênico pela técnica de RNAi, a inibição de apenas uma lacase resultou em alterações na parede celular do xilema, mas, não reduziu a quantidade de lignina. Porém, o silenciamento de 29 lacases alvos do miR397, acarretou na redução de lignina presente na madeira da planta (LU et al., 2013; BARROS et al., 2015).

Considerando que o miR397 regula genes de lacase, a repressão deste miRNA resulta na indução desta enzima, possibilitando a criação de uma barreira física contra a invasão do patógeno, como observado no nível de expressão do miR397 em colmos da cultivar RB86-7515 (tolerante) nos períodos de 72, 144 e 720 hpi (Figura 2).

No período de 24 hpi, a indução do miR397 observada em colmo da cultivar tolerante (Figura 2), pode indicar que neste período a bactéria não foi reconhecida pelo sistema de defesa da planta. Uma vez que *X. albilineans* não possui a maioria dos mecanismos de infecção conhecidos e que também são os principais sinalizadores de estresse, sugere-se que a bactéria não é reconhecida pelo mecanismo de defesa da planta, até o momento em que se instala no hospedeiro (MENSI et al., 2014; PIERETTI et al., 2015).

Em folhas da cultivar RB86-7515, o perfil de expressão do miR397 nos períodos de 24 e 72 hpi foi semelhante aos observados em colmo (Figura 3A), indicando, novamente, o reconhecimento tardio do patógeno. Além disso, nos períodos de 144 e

720 hpi o miR397 foi induzido, reprimindo a produção de lacases e conseqüentemente a biossíntese de lignina. A repressão de lacases ocasionada pela indução do miR397, durante o estresse ocasionado pela infecção, pode estar relacionada com a limitação de alguns processos biológicos, resultando na conservação de energia e de cobre, os quais seriam utilizados em funções mais essenciais no mecanismo de defesa. (LI et al., 2011).

Nas amostras de folhas da cultivar SP78-4467, o miR397 foi reprimido em 24 hpi. Isto sugere que o patógeno foi reconhecido pelo sistema imune da planta. Porém, em 72 hpi, o miR397 foi induzido e a indução foi mantida nos demais períodos (144 e 360 hpi), equivalendo-se o nível das plantas controle em 720 hpi (Figura 1). Isto demonstra que o reconhecimento do patógeno é lento e indicando a suscetibilidade da cultivar (YANG; SHAH; KLESSIG, 1997; KELLER, 1999; CHE et al., 2002).

Em colmos, os níveis de expressão do miR397 seguiu o mesmo padrão das folhas, confirmando o reconhecimento tardio do patógeno. Porém, a expressão do miRNA foi reprimida em 360 e 720 hpi (Figura 2), o que poderia estar relacionado com os estágios iniciais da infecção, em que o patógeno permanece apenas no xilema da planta pelo período de 15 dias (360 h). Após esse período, a *X. albilineans* atinge outras áreas da planta, como bainha do parênquima, cloroplasto, floema, esclerênquima, entre outras (MENSI et al., 2014). Uma vez que a metodologia utilizada neste trabalho foi a de inocular o patógeno no colmo das plantas, esse resultado poderia ter sido diferente se a inoculação tivesse sido realizada em folhas.

Analisando-se o perfil de expressão do miR397 entre os tecidos (folhas e colmos) da cultivar RB86-7515, foi possível verificar uma semelhança nos dois primeiros períodos (24 e 72 hpi) e expressões opostas no decorrer dos experimentos. A cultivar SP78-4467 apresentou um perfil de expressão semelhante entre os tecidos (Figura 3).

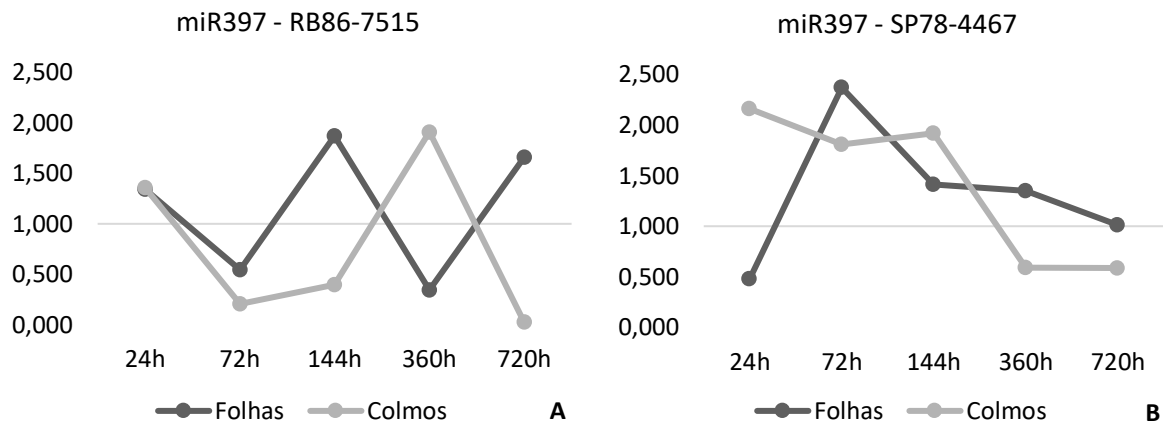


Figura 3. Perfil de expressão do miR397 em folhas e colmos da cultivar tolerante RB86-7515 (A) e da cultivar suscetível SP78-4467 (B), submetidas à infecção por *X. albilineans* durante os períodos de 24, 72, 144, 360 e 720 hpi.

Neste sentido, os resultados obtidos no experimento indicam que a expressão do miR397 no colmo da cultivar RB86-7515 está mais relacionada com o mecanismo de defesa mediada por lignificação do que em folhas, o qual pode ser observado nos períodos de 72, 144 e principalmente no período de 720 hpi (Figura 3A).

Determinadas culturas, principalmente a da cana-de-açúcar, podem se beneficiar com um menor teor de lignina na biomassa, pois, a digestibilidade da forragem, no caso do uso em alimentação animal, e a produção de biocombustível é facilitada. Nesse sentido, os estudos com o miR397 tornam-se interessantes para o desenvolvimento de culturas economicamente viáveis (WANG et al., 2014a).

### 4.3. Perfil de expressão do miR319

Os níveis de expressão do miR319 foram contrastantes entre as duas cultivares. Em folhas da cultivar RB86-7515 (tolerante), o miR319 foi reprimido apenas em 360 hpi (50%) e induzido nos demais períodos (24, 72, 144 e 720 hpi). Em 144 hpi, foi possível observar a indução máxima (738%) deste miRNA na cultivar tolerante. Analisando-se os níveis de expressão deste miRNA na cultivar SP78-4467 (suscetível), verificou-se a indução em apenas um período (72 hpi, 266%). Nos demais períodos, os valores de expressão do miR319 se mantiveram reprimidos nesta cultivar. Em 144 hpi, o nível de expressão deste miRNA na cultivar suscetível (0,893)



foi muito próximo do nível estabelecido para as plantas controle (1). Comparando o valor da expressão relativa em 360 hpi da cultivar suscetível com a cultivar tolerante, verificou-se que os mesmos encontravam-se próximos. Em 24 e 720 hpi (período inicial e final avaliado, respectivamente), observaram-se as maiores repressões do miR319 na cultivar SP78-4467, com valores próximos entre si (Figura 4 e Tabela 9).

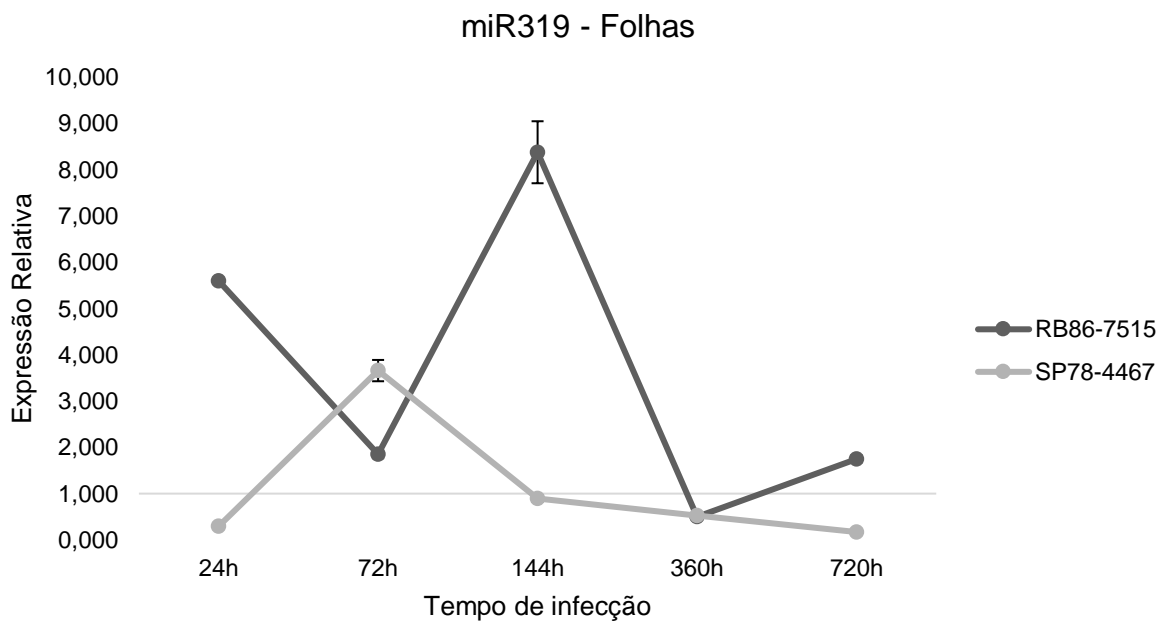


Figura 4. Perfil de expressão do miR319 nas folhas das cultivares SP78-4467 (suscetível) e RB86-7515 (tolerante) submetidas à infecção por *X. albilineans* durante os períodos de 24, 72, 144, 360 e 720 hpi, em relação às plantas controle. Os valores de expressão relativa foram estabelecidos pela razão entre a expressão do gene alvo e o controle, o qual foi considerado 1.

Tabela 9. Valores de expressão do miR319 de folhas das cultivares SP78-4467 (suscetível) e RB86-7515 (tolerante) em relação ao seu respectivo controle. O desvio padrão baseou-se na triplicata da reação. Os valores de expressão relativa foram estabelecidos pela razão entre a expressão do gene alvo e o controle, o qual foi considerado 1.

Cultivares	Tempo de infecção				
	24 h	72 h	144 h	360 h	720 h
RB86-7515	5,600 ± 0,0586	1,850 ± 0,0854	8,380 ± 0,6700	0,499 ± 0,0185	1,750 ± 0,0737
SP78-4467	0,297 ± 0,0064	3,660 ± 0,2303	0,893 ± 0,0687	0,530 ± 0,0358	0,170 ± 0,0106

Em relação aos colmos, observou-se que os níveis de expressão do miR319 foram reprimidos no período de 24 hpi e induzido nos demais períodos. A maior indução foi encontrada no período de 360 hpi (666%) para a cultivar SP78-4467 (suscetível). Para a cultivar RB86-7515 (tolerante), ocorreram oscilações entre períodos avaliados, com indução acima de 900% no período de 24 hpi e repressão de 4 vezes em 720 hpi. Neste espaço de tempo, a indução em 144 hpi também foi considerável (Figura 5 e Tabela 10).

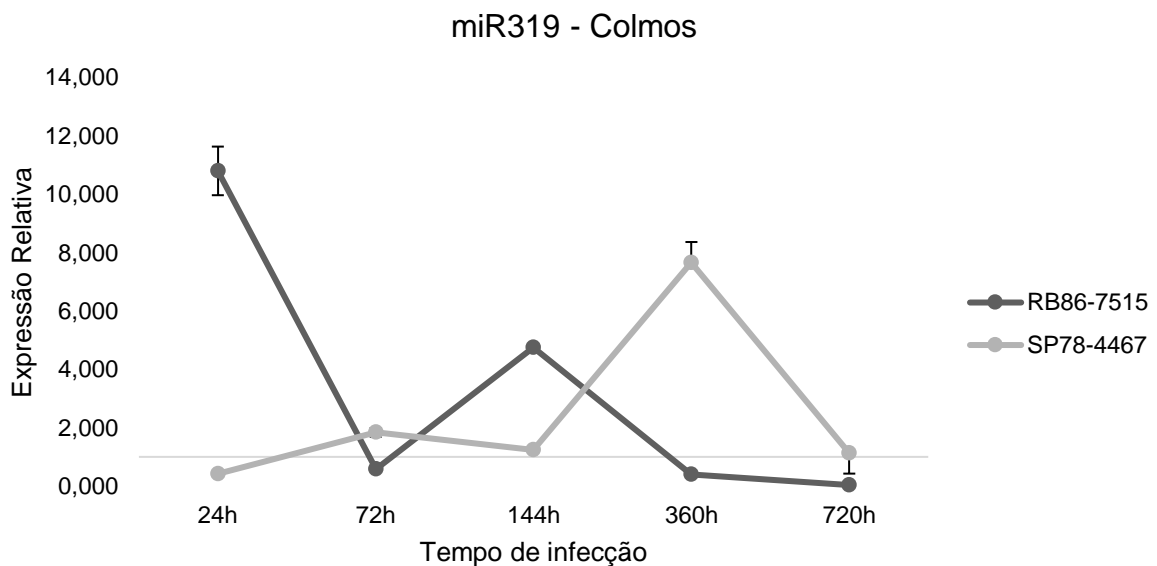


Figura 5. Perfil de expressão do miR319 em colmos das cultivares SP78-4467 (suscetível) e RB86-7515 (tolerante) submetidas à infecção por *X. albilineans* durante os períodos de 24, 72, 144, 360 e 720 hpi, em relação às plantas controle. Os valores de expressão relativa foram estabelecidos pela razão entre a expressão do gene alvo e o controle, o qual foi considerado 1.

Tabela 10. Valores de expressão do miR319 em colmos nas cultivares SP78-4467 (suscetível) e RB86-7515 (tolerante) em relação ao seu respectivo controle. O desvio padrão baseou-se na triplicata da reação. Os valores de expressão relativa foram estabelecidos pela razão entre a expressão do gene alvo e o controle, o qual foi considerado 1.

Cultivares	Tempo de infecção				
	24 h	72 h	144 h	360 h	720 h
RB86-7515	10,800 ± 0,8327	0,575 ± 0,0142	4,740 ± 0,0321	0,391 ± 0,0160	0,035 ± 0,0072
SP78-4467	0,421 ± 0,0225	1,840 ± 0,1493	1,230 ± 0,0600	7,660 ± 0,7030	1,130 ± 0,0289

O miR319 foi o primeiro miRNA vegetal cujo gene alvo foi testado de forma experimental. Inicialmente, os alvos eram determinados apenas por predições computacionais (SCHOMMER et al., 2008), seguindo basicamente a mesma metodologia de predição utilizada neste trabalho. Este miRNA foi descrito como regulador da família de fatores de transcrição (TF) TCP (TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA e PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN FACTOR1) e fatores de transcrição MYB (SCHWAB et al., 2005; SCHOMMER et al., 2008; ZHANG et al., 2009). Isto significa que este miRNA está envolvido em diferentes processos biológicos, tais como, desenvolvimento, regulação hormonal [sinalização de giberelina (GA), ABA, JA, SA] e resposta aos estresses bióticos e abióticos (JONES-RHOADES; BARTEL, 2004; SCHOMMER et al., 2008; THIEBAUT et al., 2012b; ZHAO et al., 2015).

Os TFs são importantes reguladores de processos celulares, estão amplamente distribuídos em plantas e podem interagir entre si, assim como TCP interage com MYB (AMBAWAT et al., 2013). Já foi descrito que o gene GAMyB, pertencente à família MYB, é regulado pelo fitohormônio ABA em cana-de-açúcar (THIEBAUT et al., 2012b). O miR319 por sua vez, reprime indiretamente componentes da via de sinalização de ABA, promovendo a sinalização mediada por SA (CAO; YOSHIOKA; DESVEAUX, 2011; ZHANG et al., 2011b). Assim como o ABA, o fitohormônio JA também está relacionado com mecanismos de defesa e possui sinalização oposta ao SA. O JA é regulado por um TCP que possui como alvo a enzima *LOX2*, a qual sintetiza uma enzima cloroplástica responsável pelo primeiro passo da via de JA (ZHANG et al., 2011a).

Ao analisarmos a sinalização dos fitohormônios em resposta ao estresse biótico, as características do patógeno precisam ser consideradas. Os fitopatógenos podem ser classificados de acordo com o seu processo para obtenção de nutrientes: biotróficos, necrotróficos e hemibiotróficos. Patógenos biotróficos retiram nutrientes de tecidos vivos e a planta mantém-se viva até que o mesmo complete o seu ciclo de vida. Um sistema de secreção do tipo T3SS é utilizado neste grupo de patógenos para modular a maquinaria celular do hospedeiro e obter nutrientes, além de impedir os mecanismos de defesa (GLAZEBROOK, 2005; CHEN et al., 2010; CAO; YOSHIOKA; DESVEAUX, 2011; FATIMA; SENTHIL-KUMAR, 2015). Os patógenos necrotróficos

extraem nutrientes de células mortas através da secreção de enzimas que degradam a parede celular, necrosam e destroem o tecido até a morte da planta (LALUK; MENGISTE, 2010; FATIMA; SENTHIL-KUMAR, 2015). Os patógenos hemibiotróficos, por sua vez, possuem características de ambos bio e necrotróficos, variando de acordo com o seu estágio de desenvolvimento e condições ambientais (CAO; YOSHIOKA; DESVEAUX, 2011; FATIMA; SENTHIL-KUMAR, 2015). Este conhecimento é importante porque as sinalizações hormonais que são desencadeadas no hospedeiro estão relacionadas com o tipo de patógeno. Sinalização por SA por exemplo, é iniciada contra patógenos biotróficos e hemibiotróficos, enquanto que patógenos necrotróficos e alguns hemibiotróficos, estão relacionados com a sinalização por JA e ABA (GLAZEBROOK, 2005; LALUK; MENGISTE, 2010; CAO; YOSHIOKA; DESVEAUX, 2011; FATIMA; SENTHIL-KUMAR, 2015)

Nas folhas da cultivar tolerante RB86-7515, o miR319 foi induzido nos períodos de 24, 72, 144 e 720 hpi (Figura 4). Isto significa que este miRNA está suprimindo as vias de sinalização de ABA e JA, promovendo a sinalização mediada por SA. Este resultado pode indicar o reconhecimento de *X. albilineans* pela planta, uma vez que a bactéria apresenta características de microrganismos hemibiotróficos (PIERETTI et al., 2015).

No período inicial de 24 hpi, o miR319 foi altamente induzido em colmos da cultivar tolerante, demonstrando o reconhecimento imediato e a sinalização mediada por SA (Figura 5). O inverso pode ser observado tanto em folhas, quanto em colmos da cultivar SP78-4467, no qual o miRNA estava reprimido no primeiro período (Figura 6B).

Mesmo sendo suscetível, o miR319 na cultivar SP78-4467 foi induzido no período de 360 hpi em colmos (Figura 5), indicando que a infecção pelo patógeno é estabelecida após 15 dias (MENSI et al., 2014), da mesma maneira como ocorreu para o miR397. No entanto, nos períodos finais, houve diminuição da indução, com valores próximos das plantas controle, sendo mais um indício de suscetibilidade desta cultivar.

O miR319 apresentou o mesmo perfil de expressão em folhas e colmos da cultivar RB86-7515 (tolerante), enquanto que na cultivar SP78-4467 (suscetível) o perfil de expressão sofreu alteração a partir do período de 144 hpi (Figura 6).

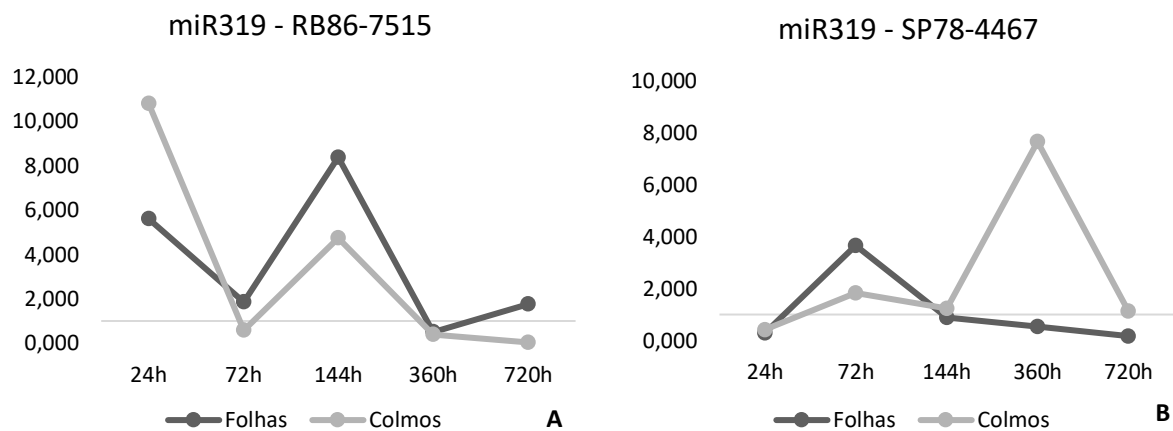


Figura 6. Perfil de expressão do miR319 em folhas e colmos da cultivar tolerante RB86-7515 (A) e da cultivar suscetível SP78-4467 (B), submetidas à infecção por *X. albilineans* durante os períodos de 24, 72, 144, 360 e 720 hpi.

Como o miR319 participa da regulação de TFs responsáveis pela modulação de diversos fito hormônios, os níveis de indução de ambos os tecidos e cultivares, sugerem que tanto o desenvolvimento da planta quanto os mecanismos de defesa, são modulados ao mesmo tempo durante o estresse (KHRAIWESH; ZHU; ZHU, 2012).

Por outro lado, dentre as espécies de *Xanthomonas* sp., apenas a *X. albilineans* possui a capacidade de produzir o composto albicidina, um inibidor da DNA girase cloroplástica, que conseqüentemente, bloqueia a diferenciação dos cloroplastos (BIRCH, 2001; FINKING; MARAHIEL, 2004; HASHIMI et al., 2007). Isto também pode estar relacionado com os diversos níveis de expressão e sinalizações encontrados neste trabalho para o miR319, uma vez que a maioria dos hormônios vegetais, incluindo o ABA e JA, são produzidos nos cloroplastos (TAIZ, L. AND ZEIGER, 2002).

#### 4.4. Perfil de expressão dos genes Lac12/13 e GAMyB, alvos do miR397 e miR319

Os genes Lac12/13 e GAMyB, alvos preditos para o miR397 e miR319, foram avaliados em dois períodos (24 e 720 hpi) e os resultados sugeriram uma possível regulação dos mesmos pelos miRNAs em ambas as cultivares. A regulação de Lac12/13 pelo miR397 foi mais evidente na cultivar RB86-7515 (tolerante), principalmente no período de 720 hpi, com alta repressão do miR397 e consequente indução do gene Lac12/13 (275%). Na cultivar suscetível, a regulação do gene alvo Lac12/13 pelo miR397 não ocorreu conforme o esperado. Em ambas cultivares, a expressão do gene GAMyB, alvo do miR319 ocorreu conforme o esperado, pois apresentou relação antagonista entre indução e repressão (Figura 7 e Tabela 11).

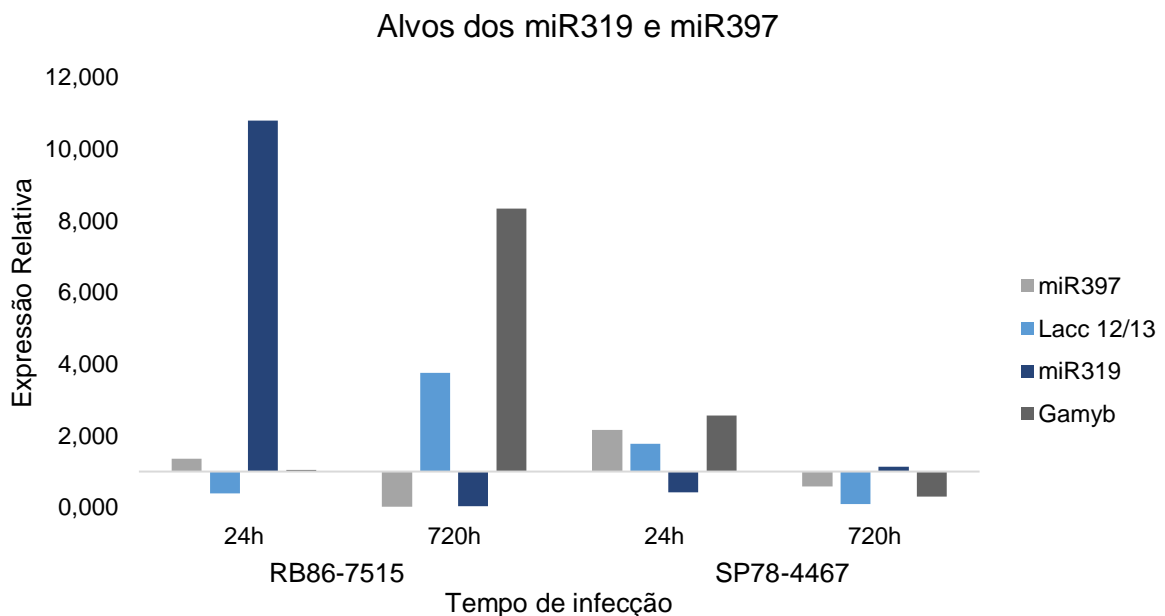


Figura 7. Perfil de expressão dos possíveis genes Lac12/13 e GAMyB alvos dos miRNAs miR319 e miR397 de colmos das cultivares SP78-4467 (suscetível) e RB86-7515 (tolerante) submetidas à infecção por *X. albilineans* durante os períodos de 24 e 720h, em relação às plantas controle. Os valores de expressão relativa foram estabelecidos pela razão entre a expressão do gene alvo e o controle, o qual foi considerado 1.

Tabela 11. Valores de expressão dos possíveis genes Lac12/13 e GAMyB alvos dos miR397 e miR319 encontrados em cana-de-açúcar, avaliados nos períodos de 24 e 720 hpi.

Cultivares	miR397 / Lac 12/13		miR319 / GAMyB	
	24 h	720 h	24 h	720 h
RB86-7515	1,360 / 0,386	0,024 / 3,750	10,80 / 1,050	0,035 / 8,340
SP78-4467	2,160 / 1,780	0,587 / 0,091	0,421 / 2,570	1,130 / 0,294

Para ser considerado um possível alvo, o gene deve ser regulado negativamente pelo miRNA. O perfil de expressão entre os miRNAs e genes alvos precisam ocorrer de forma antagônica, ou seja, se a expressão de um miRNA está induzida o seu gene alvo deverá ser reprimido e vice-versa (THOMSON; BRACKEN; GOODALL, 2011).

Um único miRNA pode regular vários genes e um único gene pode ser regulado por vários miRNAs. Encontrar os genes alvos de cada miRNA é fundamental para elucidar o PTGS e como cada miRNA irá atuar no organismo em estudo.

De acordo com os nossos resultados, o miR397 não está regulando o gene Lac12/13 na cultivar suscetível SP78-4467 (Figura 7). Isto indica que este miRNA poderia estar regulando outros genes de lacase, ou então, que o gene Lac12/13 pode estar sendo regulado por outros miRNAs. Existem relatos na literatura de que genes de lacase podem ser regulados também pelos miRNAs miR408, miR857 e miR528, além do miR397 (WANG et al., 2014a).

Na cultivar tolerante RB86-7515, o miR397 foi expresso antagonicamente em relação ao gene alvo Lac12/13 (Figura 7). Isto corrobora com o fato de que os miRNAs regulam negativamente os seus genes alvos (RUIZ-FERRER; VOINNET, 2009; THOMSON; BRACKEN; GOODALL, 2011). Analisando o miR319, foi possível verificar que, em ambas as cultivares, o miRNA regulou o gene GAMyB (Figura 7).

Os resultados obtidos no presente trabalho comprovam que predições computacionais podem ser utilizadas como formas de análises, no entanto, devem ser complementares aos estudos com miRNAs.

## 5. CONCLUSÃO

- A cultivar tolerante RB86-7515 apresenta resposta de defesa precoce contra *X. albilineans*;
- Lac12/13 é um gene alvo do miR397 na cultivar tolerante RB86-7515 e não foi na cultivar suscetível SP78-4467;
- GAMyB é um gene alvo do miR319 em ambas cultivares;
- O miR319 está mais relacionado com o mecanismo de defesa da planta infectada por *X. albilineans*.



## 6. REFERÊNCIAS

- ABDEL-GHANY, S. E.; PILON, M. MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in Arabidopsis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 23, p. 15932–15945, 6 jun. 2008.
- ALVAREZ, A. M.; SCHENCK, S.; BENEDICT, A. A. Differentiation of Xanthomonas albilineans strains with monoclonal antibody reaction patterns and DNA fingerprints. **Plant Pathology**, v. 45, n. 2, p. 358–366, abr. 1996.
- AMBAWAT, S. et al. MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. **Physiology and molecular biology of plants : an international journal of functional plant biology**, v. 19, n. 3, p. 307–21, 2013.
- BANNENBERG, G. et al. Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of Arabidopsis thaliana. **Lipids**, v. 44, n. 2, p. 85–95, fev. 2009.
- BARROS, J. et al. The cell biology of lignification in higher plants. **Annals of Botany**, v. 115, n. 7, p. 1053–1074, jun. 2015.
- BERTHET, S. et al. Disruption of LACCASE4 and 17 results in tissue-specific alterations to lignification of Arabidopsis thaliana stems. **The Plant cell**, v. 23, n. 3, p. 1124–1137, 2011.
- BIRCH, R. G. Xanthomonas albilineans and the antipathogenesis approach to disease control. **Molecular Plant Pathology**, v. 2, n. 1, p. 1–11, jan. 2001.
- BONNET, E. et al. Detection of 91 potential conserved plant microRNAs in Arabidopsis thaliana and Oryza sativa identifies important target genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 31, p. 11511–6, 3 ago. 2004.
- BORKOW, G.; GABBAY, J. Putting copper into action: copper-impregnated products with potent biocidal activities. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 18, n. 7, p. 1728–1730, 2004.
- CAO, F. Y.; YOSHIOKA, K.; DESVEAUX, D. **The roles of ABA in plant-pathogen interactions** *Journal of Plant Research* Springer Japan, , 5 jul. 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10265-011-0409-y>>. Acesso em: 29 mar. 2017
- CARNAVALE BOTTINO, M. et al. High-Throughput Sequencing of Small RNA Transcriptome Reveals Salt Stress Regulated MicroRNAs in Sugarcane. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e59423, 27 mar. 2013.
- CASAGRANDE, M. V; SANGUINO, A.; FERREZINI, E. Evolução, prejuízos e métodos de controle de quatro importantes doenças da cana-de-açúcar. **Seminário de Tecnologia Agrônômica**, v. 7, p. 183–190, 1997.

CHAMPOISEAU, P.; ROTT, P.; DAUGROIS, J.-H. Epiphytic Populations of *Xanthomonas albilineans* and Subsequent Sugarcane Stalk Infection Are Linked to Rainfall in Guadeloupe. **Plant Disease**, v. 93, n. 4, p. 339–346, abr. 2009.

CHATTERJEE, S.; ALMEIDA, R. P.; LINDOW, S. Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. **Annu Rev Phytopathol**, v. 46, n. 1, p. 243–271, set. 2008.

CHE, F.-S. et al. Identification of novel genes differentially expressed in compatible and incompatible interactions between rice and *Pseudomonas avenae*. **Plant Science**, v. 162, n. 3, p. 449–458, mar. 2002.

CHEN, L.-Q. et al. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. **Nature**, v. 468, n. 7323, p. 527–32, 2010.

CONAB. Monitoramento Agrícola. **Companhia Nacional de Abastecimento**, v. 2, n. 9, p. 1–104, 2015.

DABBAS, K. M. et al. Genes diferencialmente expressos em cana-de-açúcar inoculada com *Xanthomonas albilineans*, o agente causal da escaldadura da folha. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 4, p. 328–338, set. 2006.

DANGL, J. L. **Bacterial Pathogenesis of Plants and Animals**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1994. v. 192

DANIELS, J.; ROACH, B. T. **Sugarcane Improvement through Breeding**. [s.l.] Elsevier, 1987. v. 11

DAUGROIS, J. H. et al. Aerial contamination of sugarcane in Guadeloupe by two strains of *Xanthomonas albilineans*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, p. 445–458, 2003.

DAVIS, M. J. Evaluation of Selective Media and Immunoassays for Detection of *Xanthomonas albilineans*, Causal Agent of Sugarcane Leaf Scald Disease. **Plant Disease**, v. 78, n. 1, p. 78, 1994.

DIXON, R. A.; HARRISON, M. J.; LAMB, C. J. Early Events in the Activation of Plant Defense Responses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, n. 1, p. 479–501, set. 1994.

FAHLGREN, N. et al. High-throughput sequencing of *Arabidopsis* microRNAs: evidence for frequent birth and death of MIRNA genes. **PloS one**, v. 2, n. 2, p. e219, jan. 2007.

FATIMA, U.; SENTHIL-KUMAR, M. Plant and pathogen nutrient acquisition strategies. **Frontiers in plant science**, v. 6, n. September, p. 750, 17 set. 2015.

FERREIRA, T. H. et al. microRNAs associated with drought response in the bioenergy crop sugarcane (*Saccharum* spp.). **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e46703, jan. 2012.

FINKING, R.; MARAHIEL, M. A. Biosynthesis of nonribosomal peptides<sup>1</sup>. **Annual review of microbiology**, v. 58, p. 453–88, jan. 2004.

GENTILE, A. et al. Effects of drought on the microtranscriptome of field-grown sugarcane plants. **Planta**, v. 237, n. 3, p. 783–798, 2013.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual review of phytopathology**, v. 43, p. 205–27, jan. 2005.

GUSTINE, D. L. Metabolites from *Pseudomonas corrugata* Elicit Phytoalexin Biosynthesis in White Clover. **Phytopathology**, v. 80, n. 12, p. 1427, 1990.

HAMMERSCHMIDT, R.; KUĆ, J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. **Physiological Plant Pathology**, v. 20, n. 1, p. 61–71, jan. 1982.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. Response to pathogens. In: **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. [s.l.: s.n.]. p. 1367.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Resistance Gene-Dependent Plant Defense Responses. **The Plant Cell**, v. 8, n. 10, p. 1773, out. 1996.

HASHIMI, S. M. et al. The phytotoxin albicidin is a novel inhibitor of DNA gyrase. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 181–7, jan. 2007.

JAUFEERALLY-FAKIM, Y. et al. Genetic identification of the leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*, in Mauritius using a new set of specific primers. **Sugar Cane International**, n. October, p. 7–13, 2000.

JONES-RHOADES, M. W.; BARTEL, D. P. Computational identification of plant MicroRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. **Molecular Cell**, v. 14, n. 6, p. 787–799, 2004.

KELLER, H. Pathogen-Induced Elicitin Production in Transgenic Tobacco Generates a Hypersensitive Response and Nonspecific Disease Resistance. **THE PLANT CELL ONLINE**, v. 11, n. 2, p. 223–236, 1 fev. 1999.

KHRAIWESH, B.; ZHU, J.-K.; ZHU, J. Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1819, n. 2, p. 137–148, 2012.

KOVÁTS, K.; BINDER, A.; HOHL, H. R. Cytology of induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Planta**, v. 183, n. 4, p. 484–90, mar. 1991.

KOZOMARA, A.; GRIFFITHS-JONES, S. MiRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, 2014.

KULCHESKI, F. R. et al. Identification of novel soybean microRNAs involved in abiotic and biotic stresses. **BMC genomics**, v. 12, p. 307, jan. 2011.

- LALUK, K.; MENGISTE, T. Necrotroph attacks on plants: wanton destruction or covert extortion? **The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists**, v. 8, p. e0136, 2010.
- LARKIN, M. A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947–2948, 1 nov. 2007.
- LEGAZ, M.-E. et al. Sugarcane glycoproteins may act as signals for the production of xanthan in the plant-associated bacterium *Xanthomonas albilineans*. **Plant signaling & behavior**, v. 6, n. 8, p. 1132–9, ago. 2011.
- LEON-REYES, A. et al. Salicylate-mediated suppression of jasmonate-responsive gene expression in *Arabidopsis* is targeted downstream of the jasmonate biosynthesis pathway. **Planta**, v. 232, n. 6, p. 1423–32, nov. 2010.
- LEYNS, F. et al. The host range of the genus *Xanthomonas*. **The Botanical Review**, v. 50, n. 3, p. 308–356, jul. 1984.
- LI, T. et al. Identification and analysis of seven H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-responsive miRNAs and 32 new miRNAs in the seedlings of rice (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 7, p. 2821–2833, 1 abr. 2011.
- LOPES, S. A.; DAMANN, K. E. PCR detection of *X. albilineans* from vascular sap of cane. **Sugar Cane**, v. No. 5, p. 13–18, 1997.
- LU, S. et al. Ptr-miR397a is a negative regulator of laccase genes affecting lignin content in *Populus trichocarpa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 26, p. 10848–53, 25 jun. 2013.
- MENSI, I. et al. Breaking dogmas: the plant vascular pathogen *Xanthomonas albilineans* is able to invade non-vascular tissues despite its reduced genome. **Open biology**, v. 4, p. 130116, jan. 2014.
- NAVARRO, L. et al. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. **Science (New York, N.Y.)**, v. 312, n. 5772, p. 436–9, 21 abr. 2006.
- ORTIZ-MOREA, F. A. et al. Global analysis of the sugarcane microtranscriptome reveals a unique composition of small RNAs associated with axillary bud outgrowth. **Journal of experimental botany**, v. 64, n. 8, p. 2307–20, 5 maio 2013.
- PEDERSEN, I.; DAVID, M. MicroRNAs in the immune response. **Cytokine**, v. 43, n. 3, p. 391–4, set. 2008.
- PÉREZ-DONOSO, A. G. et al. Cell wall-degrading enzymes enlarge the pore size of intervessel pit membranes in healthy and *Xylella fastidiosa*-infected grapevines. **Plant physiology**, v. 152, n. 3, p. 1748–59, 1 mar. 2010.

- PÉREZ-QUINTERO, Á. L. et al. Bioinformatic identification of cassava miRNAs differentially expressed in response to infection by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **BMC plant biology**, v. 12, p. 29, jan. 2012.
- PIERETTI, I. et al. The complete genome sequence of *Xanthomonas albilineans* provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited Xanthomonadaceae. **BMC genomics**, v. 10, p. 616, jan. 2009.
- PIERETTI, I. et al. Genomic insights into strategies used by *Xanthomonas albilineans* with its reduced artillery to spread within sugarcane xylem vessels. **BMC genomics**, v. 13, p. 658, jan. 2012.
- PIERETTI, I. et al. What makes *Xanthomonas albilineans* unique amongst xanthomonads? **Frontiers in plant science**, v. 6, n. April, p. 289, 24 abr. 2015.
- PROCÓPIO, S. DE O. et al. **Manejo de plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar**. [s.l.: s.n.].
- RANOCHA, P. et al. Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar. **Plant physiology**, v. 129, n. 1, p. 145–55, maio 2002.
- RICAUD, C.; RYAN, C. C. **Diseases of Sugarcane**. [s.l.] Elsevier, 1989.
- ROPER, M. C. et al. *Xylella fastidiosa* requires polygalacturonase for colonization and pathogenicity in *Vitis vinifera* grapevines. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 20, n. 4, p. 411–419, abr. 2007.
- ROSSETTO, R.; SANTIAGO, A. **Doenças da cana-de-açúcar**. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01\\_55\\_711200516718.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_55_711200516718.html)>. Acesso em: 6 mar. 2017.
- ROTT, P. et al. **A Guide to Sugarcane Diseases**. [s.l.] Cirad, 2000.
- ROYER, M. et al. Genome mining reveals the genus *Xanthomonas* to be a promising reservoir for new bioactive non-ribosomally synthesized peptides. **BMC genomics**, v. 14, p. 658, jan. 2013.
- RUIZ-FERRER, V.; VOINNET, O. Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. **Annual review of plant biology**, v. 60, p. 485–510, jan. 2009.
- RYAN, R. P. et al. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 344–55, maio 2011.
- SCHOMMER, C. et al. Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. **PLoS Biology**, v. 6, n. 9, p. 1991–2001, 23 set. 2008.
- SCHWAB, R. et al. Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. **Developmental Cell**, v. 8, n. 4, p. 517–527, abr. 2005.

SHEN, D. et al. Identification and characterization of microRNAs in oilseed rape ( *Brassica napus* ) responsive to infection with the pathogenic fungus *Verticillium longisporum* using Brassica AA ( *Brassica rapa* ) and CC ( *Brassica oleracea* ) as reference genomes. **New Phytologist**, v. 204, n. 3, p. 577–594, nov. 2014.

SILVA, M. DE S. E.; BEDENDO, I. P.; CASAGRANDE, M. V. Caracterização molecular e patogênica de isolados de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, agente causal da escaldadura das folhas da cana-de-açúcar. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 4, p. 341–347, dez. 2007.

SILVA, R. L. DE O. et al. Validation of Novel Reference Genes for Reverse Transcription Quantitative Real-Time PCR in Drought-Stressed Sugarcane. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–12, 2014.

SOUZA, T. P.; DIAS, R. O.; SILVA-FILHO, M. C. Defense-related proteins involved in sugarcane responses to biotic stress. **Genetics and Molecular Biology**, n. ahead, p. 0–0, 2017.

SUNKAR, R. et al. Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. **Trends in plant science**, v. 12, n. 7, p. 301–9, jul. 2007.

TAIZ, L. AND ZEIGER, E. **Plant physiology**. [s.l.: s.n.]. v. 91

TARDIANI, A. C. et al. Molecular and Pathogenic Diversity Among Brazilian Isolates of *Xanthomonas albilineans* Assessed with SSR Marker Loci. **Plant Disease**, v. 98, n. 4, p. 540–546, 5 abr. 2014.

THIEBAUT, F. et al. Computational identification and analysis of novel sugarcane microRNAs. **BMC genomics**, v. 13, p. 290, jan. 2012a.

THIEBAUT, F. et al. Regulation of miR319 during cold stress in sugarcane. **Plant, cell & environment**, v. 35, n. 3, p. 502–12, mar. 2012b.

THIEBAUT, F. et al. Differential sRNA regulation in leaves and roots of sugarcane under water depletion. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

THOMSON, D. W.; BRACKEN, C. P.; GOODALL, G. J. **Experimental strategies for microRNA target identification** *Nucleic Acids Research*, 2011.

TOKESHI, H. Doenças da Cana-de-Açúcar. In: KIMATI, H. et al. (Eds.). . **Manual de Fitopatologia - Volume 2**. 4. ed. [s.l.] Ceres, 2005. p. 199–215.

TURNER, J. G.; ELLIS, C.; DEVOTO, A. The jasmonate signal pathway. **The Plant cell**, v. 14 Suppl, p. S153–S164, 2002.

VAN DEN MOOTER, M.; SWINGS, J. Numerical Analysis of 295 Phenotypic Features of 266 *Xanthomonas* Strains and Related Strains and an Improved Taxonomy of the Genus. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 40, n. 4, p. 348–369, 1 out. 1990.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual review of phytopathology**, v. 44, p. 135–62, 2006.

VARKONYI-GASIC, E.; HELLENS, R. P. Quantitative stem-loop RT-PCR for detection of microRNAs. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 744, p. 145–157, 2011.

VETTORE, A. L. et al. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome research**, v. 13, n. 12, p. 2725–35, dez. 2003.

VOINNET, O. Post-transcriptional RNA silencing in plant-microbe interactions: a touch of robustness and versatility. **Current opinion in plant biology**, v. 11, n. 4, p. 464–70, ago. 2008.

VOINNET, O. **Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs** Cell, 2009.

WANG, C. Y. et al. MiR397b regulates both lignin content and seed number in Arabidopsis via modulating a laccase involved in lignin biosynthesis. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, n. 8, p. 1132–1142, out. 2014a.

WANG, J.-F. et al. Identification of 20 microRNAs from *Oryza sativa*. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 5, p. 1688–95, jan. 2004a.

WANG, L. et al. Economic and GHG emissions analyses for sugarcane ethanol in Brazil: Looking forward. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 40, p. 571–582, dez. 2014b.

WANG, X.-J. et al. Prediction and identification of *Arabidopsis thaliana* microRNAs and their mRNA targets. **Genome biology**, v. 5, n. 9, p. R65, jan. 2004b.

XIE, Z. et al. Expression of *Arabidopsis* MIRNA genes. **Plant physiology**, v. 138, n. 4, p. 2145–54, ago. 2005.

YANG, Y.; SHAH, J.; KLESSIG, D. F. Signal perception and transduction in plant defense responses. **Genes & Development**, v. 11, n. 13, p. 1621–1639, 1 jul. 1997.

YUAN, M. et al. The bacterial pathogen *Xanthomonas oryzae* overcomes rice defenses by regulating host copper redistribution. **The Plant cell**, v. 22, n. 9, p. 3164–3176, 2010.

ZANCA, A. S. et al. Identification and expression analysis of microRNAs and targets in the biofuel crop sugarcane. **BMC plant biology**, v. 10, p. 260, jan. 2010.

ZHANG, L. et al. A genome-wide characterization of microRNA genes in maize. **PLoS genetics**, v. 5, n. 11, p. e1000716, nov. 2009.

ZHANG, L. et al. Identification and temporal expression analysis of conserved and novel microRNAs in *Sorghum*. **Genomics**, v. 98, n. 6, p. 460–8, dez. 2011a.

ZHANG, L.; BIRCH, R. G. The gene for albicidin detoxification from *Pantoea dispersa* encodes an esterase and attenuates pathogenicity of *Xanthomonas albilineans* to sugarcane. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 18, p. 9984–9989, 2 set. 1997.

ZHANG, W. et al. Bacteria-responsive microRNAs regulate plant innate immunity by modulating plant hormone networks. **Plant Molecular Biology**, v. 75, n. 1, p. 93–105, 12 jan. 2011b.

ZHAO, Q. et al. Laccase is necessary and nonredundant with peroxidase for lignin polymerization during vascular development in *Arabidopsis*. **The Plant cell**, v. 25, n. 10, p. 3976–87, out. 2013.

ZHAO, W. et al. Identification of jasmonic acid-associated microRNAs and characterization of the regulatory roles of the miR319/TCP4 module under root-knot nematode stress in tomato. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 15, p. 4653–4667, ago. 2015.