

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ALTERAÇÕES NO PERFIL DE METILAÇÃO DO DNA E  
IDENTIFICAÇÃO DE TRANSCRITOS DIFERENCIALMENTE  
EXPRESSOS EM CANA-DE-AÇÚCAR EM RESPOSTA AO  
SCMV (*Sugarcane mosaic virus*)**

**Marcel Fernando da Silva**  
Engenheiro Agrônomo

**2017**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ALTERAÇÕES NO PERFIL DE METILAÇÃO DO DNA E  
IDENTIFICAÇÃO DE TRANSCRITOS DIFERENCIALMENTE  
EXPRESSOS EM CANA-DE-AÇÚCAR EM RESPOSTA AO  
*SCMV (Sugarcane mosaic virus)***

**Marcel Fernando da Silva**

**Orientadora Profa. Dra. Luciana Rossini Pinto**

**Coorientador: Dr. Marcos Cesar Gonçalves**

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas)**

**2017**

S586a Silva, Marcel Fernando da  
Alterações no perfil de metilação do DNA e identificação de transcritos diferencialmente expressos em cana-de-açúcar em resposta ao SCMV (*Sugarcane mosaic virus*) / Marcel Fernando da Silva. -- Jaboticabal, 2017  
viii, 117 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientadora: Luciana Rossini Pinto

Coorientador: Marcos Cesar Gonçalves

Banca examinadora: Michael dos Santos Brito, Samira Domingues Carlin Cavallari, Dilermando Perecin, Janete Aparecida Desiderio

Bibliografia

1. Epigenética. 2. Genes candidatos. 3. Infecção viral. 4. Perfil de expressão. 5. *Saccharum officinarum*. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:633.61

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

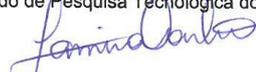
TÍTULO DA TESE: ALTERAÇÕES NO PERFIL DE METILAÇÃO DO DNA E IDENTIFICAÇÃO DE TRANSCRITOS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM CANA-DE-AÇÚCAR EM RESPOTA AO SCMV (*Sugarcane mosaic virus*)

**AUTOR: MARCEL FERNANDO DA SILVA**  
**ORIENTADORA: LUCIANA ROSSINI PINTO**  
**COORIENTADOR: MARCOS CESAR GONÇALVES**

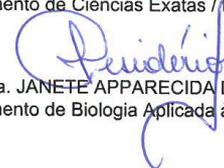
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. MARCOS CESAR GONÇALVES  
Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Vegetal / IAC - São Paulo/SP

  
Pesquisador Dr. MICHAEL DOS SANTOS BRITO  
Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Cana / IAC - Ribeirão Preto/SP

  
Pesquisadora SAMIRA DOMINGUES CARLIN CAVALLARI  
Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Cana / IAC - Ribeirão Preto/SP

  
Prof. Dr. DILERMANDO PERECIN  
Departamento de Ciências Exatas / FCAV / UNESP - Jaboticabal

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

Jaboticabal, 06 de novembro de 2017

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**MARCEL FERNANDO DA SILVA** – nascido em dezessete de dezembro de 1986 em Araraquara (SP), Brasil, ingressou em 2006, no curso de Agronomia na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal. No ano de 2011 recebeu o grau de Eng.<sup>o</sup> Agrônomo pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal. Em março de 2012 ingressou no curso de Mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), sendo bolsista CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) durante o curso. Em 2014 recebeu o grau de mestre em Genética e Melhoramento de Plantas, ingressando no curso de doutorado no mesmo ano pelo programa Genética e Melhoramento de Plantas, sendo bolsista CAPES.

## SUMÁRIO

	Página
SUMÁRIO .....	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT .....	v
LISTA DE ABREVIATURAS .....	vii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Importância da cultura da cana-de-açúcar .....	3
2.2. Taxonomia da Cana-de-açúcar, origem e diversidade .....	4
2.3. Doenças da cana-de-açúcar .....	7
2.4. Biotecnologia e o melhoramento da cana-de-açúcar.....	8
2.5. Mosaico da cana-de-açúcar .....	10
2.6. Interação patógeno-hospedeiro.....	15
2.7. Epigenética e padrões de metilação.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1. Material vegetal e tratamentos.....	28
3.2. Obtenção de marcadores MSAP .....	29
3.3. Análise dos dados MSAP .....	31
3.4. Isolamento dos fragmentos polimórficos MSAP e cDNA-AFLP .....	32
3.5. Clonagem e sequenciamento .....	32
3.6. Desenho de oligonucleotídeos iniciadores .....	36
3.7. Obtenção de cDNA.....	37
3.8. Experimentos de validação e análise de dados.....	37
4. RESULTADOS.....	38
4.1. Alterações no padrão de metilação.....	38
4.2. Sequenciamento e análise dos fragmentos MSAP polimórficos.....	43
4.3. Sequenciamento e análise dos FDEs.....	50
4.4. Genes de referência .....	55
4.5. Genes candidatos .....	58
5. DISCUSSÃO .....	61
6. CONCLUSÃO .....	74

7. REFERÊNCIAS ..... 75

## ALTERAÇÕES NO PERFIL DE METILAÇÃO DO DNA E IDENTIFICAÇÃO DE TRANSCRITOS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM CANA-DE-AÇÚCAR EM RESPOSTA AO SCMV (*Sugarcane mosaic virus*)

**RESUMO** - O mosaico da cana-de-açúcar é uma das principais viroses da cultura, sendo os estudos de padrões de metilação e de transcriptoma de contribuição para a compreensão da resistência genética à doença. O presente trabalho aplicou a técnica MSAP (“Methylation-sensitive amplified polymorphism”) em dois cultivares de cana-de-açúcar de resposta contrastante à doença do mosaico, causada pelo *Potyvirus Sugarcane mosaic virus* (SCMV), nas condições de inoculação falsa e inoculação com SCMV, para análise de alterações no padrão de metilação. As alterações no padrão de metilação causadas pela interação com o SCMV foram identificadas por meio de clonagem e sequenciamento. Fragmentos diferencialmente expressos (FDEs), previamente obtidos pela técnica cDNA-AFLP (“cDNA-amplified fragment length polymorphism”), também foram clonados e sequenciados para a identificação de genes candidatos associados à resistência ao SCMV. Em análises da frequência dos padrões de presença e ausência de bandas MSAP, níveis de metilação genômica variando de 33% a 35,4% foram observados para IAC91-1099, e de 33% a 37,3% para IACSP95-5000, com uma pequena proporção de loci alterados em resposta ao SCMV para ambos os cultivares. A análise global pelo pacote R MSAP indicou níveis de metilação genômica de 40%, além de demonstrar que as variações epigenéticas entre os cultivares ( $\Phi_{ST} = 0,32$ ;  $P = 0,008$ ) apresentaram menor extensão que as variações genéticas ( $\Phi_{ST} = 0,96$ ;  $P = 0,0067$ ). As análises AMOVA e PCoA confirmaram a pequena proporção de polimorfismos ocasionados pela infecção por SCMV, sendo as variações devidas a tempo de coleta mais proeminentes. Essas alterações, no entanto, foram específicas para os cultivares em estudo, sugerindo diferenças epigenéticas na resposta a inoculação com o SCMV. Enquanto o cultivar resistente IACSP95-5000 apresentou maiores polimorfismos de hipometilação 24 e 72 horas após a inoculação (hai) e a maior ocorrência de hipermetilação 48 hai, o cultivar suscetível IAC91-1099 apresentou uma troca entre a metilação da citosina interna e a semimetilação da citosina externa. O sequenciamento de polimorfismos MSAP decorrentes da interação com SCMV indicaram relevância para a caracterização da interação cana-de-açúcar e SCMV, uma vez que foram observados alinhamentos com transcritos com função putativa de resposta a estresses bióticos e abióticos, remodelação da cromatina e elementos transponíveis. Já os alinhamentos MSAP com região genômica revelaram possíveis regiões promotoras para os transcritos à jusante, relacionados à proteína kinase e elementos transponíveis. Os alinhamentos dos FDEs, oriundos do marcador molecular cDNA-AFLP, indicaram vias possivelmente relacionadas à fotossíntese, recuperação pós-estresse, proteínas transmembranas, resposta a estresses abióticos, elementos transponíveis e remodelação de cromatina via metilação de DNA e alterações na histona 3 (H3). A região promotora dos fragmentos MSAP e FDEs apresentou elementos reguladores responsivos a estresses, fitormônio e vias epigenéticas, além da ocorrência de ilhas CpG, sugerindo conexões entre alterações no transcriptoma e no perfil de metilação

de DNA. A validação de três FDEs por qRT-PCR revelou uma complexidade na expressão e um comportamento diferente do observado por cDNA-AFLP. Ainda assim, o FDE\_1 pode explicar alguns dos polimorfismos de hipometilação de DNA observados pelo marcador molecular MSAP, enquanto o FDE\_2 pode explicar as diferenças na expressão de sintomas de mosaico entre os cultivares. Por sua vez, a regulação negativa do FDE\_4 em IACSP95-5000 se assemelha ao observado na literatura para resistência genética em milho a um *Potyvirus* do subgrupo do SCMV.

**Palavras chave:** epigenética, genes candidatos, infecção viral, perfil de expressão, *Saccharum officinarum*

## ANALYSIS OF DNA METHYLATION PATTERN CHANGES AND IDENTIFICATION OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED TRANSCRIPTS IN SUGARCANE IN RESPONSE TO SCMV (Sugarcane mosaic virus)

**ABSTRACT** – Mosaic caused by *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) is one of the main viruses infecting sugarcane worldwide. Studies on transcriptomic analysis and methylation status of genomic DNA contribute to understand the molecular bases of resistance to mosaic. The present study used the MSAP (Methylation-sensitive amplified polymorphism) approach in two sugarcane cultivars with contrasting response for SCMV, IACSP95-5000 (resistant) and IAC91-1099 (susceptible), both under mechanical inoculation condition, along with their respective mock inoculated controls, in order to evaluate changes in DNA methylation patterns and to identify polymorphisms caused by SCMV via cloning and sequencing. Differentially expressed transcribed fragments (DTFs) previously obtained from cDNA-AFLP were also cloned and sequenced with the aim of identifying candidate genes for SCMV resistance. Analysis of MSAP patterns frequency revealed genomic methylation levels ranging from 33% to 35.4% in IAC91-1099, and from 33% to 37.3% in IACSP95-5000, with minor changes caused by interaction with SCMV for both cultivars. Global analysis performed by R MSAP package demonstrates a genomic methylation level of 40% and also reveals that epigenetic variation between cultivars ( $\Phi_{ST} = 0.32$ ;  $P = 0.008$ ) was less expressive than genetic variation ( $\Phi_{ST} = 0.96$ ;  $P = 0.0067$ ). AMOVA and PCoA analyses confirmed the little extension of alterations in cytosine methylation caused by SCMV inoculation, being the variations observed among sample time points more expressive. Nonetheless, SCMV changes in cytosine methylation were distinctive between the cultivars, suggesting epigenetic differences in response to SCMV inoculation. Whilst the resistant cultivar IACSP95-5000 showed higher frequencies of polymorphisms regarding cytosine hypomethylation 24 hours post inoculation (hpi) and 72 hpi, and higher hypermethylation polymorphisms 48 hpi, the susceptible cultivar IACSP91-1099 showed an exchange from inner cytosine methylation to external cytosine hemimethylation. The sequencing of the MSAP polymorphism caused by SCMV indicated relevance for the characterization of sugarcane-SCMV interaction, since alignments with transcripts putatively associated with biotic and abiotic stresses responses, chromatin remodeling and transposable elements were observed. In turn, MSAP alignments with genomic region showed putative promoter regions for downstream transcripts associated with protein kinase and transposable elements. DTFs alignments suggests changes in photosynthesis, post-stress recovery, activity of transmembrane proteins, responses to biotic and abiotic stresses, transposable elements and a DTF with putative function in chromatin remodeling via DNA methylation and histone 3 (H3) modification. Analyses of putative promoter regions of MSAP fragments and DTFs revealed cis acting motifs responsive to stress, phytohormones and epigenetic pathways, besides the proximity of CpG islands, suggesting a crosstalk between changes in transcriptome and cytosine methylation. The validation of three DTFs by qRT-PCR showed a complex expression and a contrasting behavior from cDNA-AFLP observations. Even though, DTF\_1 profile

expression may explain some of the hypomethylation polymorphisms observed from MSAP molecular marker, whereas DTF\_2 may explain the contrasting behavior in symptom expression between cultivars. The pronounced downregulation observed for DTF\_4 in IACSP95-5000, in turn, correlates with maize genetic resistance to a *Potyvirus* belonging to SCMV subgroup.

**Keywords:** epigenetics, candidate genes, viral infection, expression profile, *Saccharum officinarum*

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AAA – “ATPases associated with diverse cellular activities”
- cDNA-AFLP – “cDNA-amplified fragment length polymorphism”
- Clp – “Caseinolytic protease”
- ETI – “Effector triggered immunity”
- FDE – Fragmento diferencialmente exposto
- Hai – Horas após a inoculação mecânica
- HR – “Hyper-sensitive response”
- Hsp 100 – “Heat Shock Protein 100”
- MBD – “Methyl-CpG binding domain
- MDMV – *Maizedwarf mosaic virus*
- MSAP – “Methylation-sensitive amplified polymorphism”
- MSL – “Methylation susceptible loci”
- NB-LRR – “Nucleotide-binding leucine rich repeat”
- NML – “Non Methylated loci”
- PAMP – “Pathogen-associated molecular patterns”
- Pfam – “Protein family”
- PRR – “Pattern recognition receptors”
- PTI – “PAMP-triggered immunity”
- RdDM – “RNA-directed DNA methylation”
- RNAi – Interferência de RNA
- ROS – “Reactive oxygen species”
- SAR – “Systemic acquired resistance”
- SCMV – *Sugarcane mosaic virus*
- SYT – “Synaptotagmins”

TMV - *Tobacco mosaic tobamovirus*

## 1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma das principais culturas de importância econômica mundial sendo o Brasil o maior produtor com 657,18 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na safra 2016/2017 (CONAB, 2017).

O número de cultivares de cana-de-açúcar em cultivo no país é grande devido ao alto potencial produtivo dos programas de melhoramento, o que permite adaptação às diversas condições agroclimáticas, além de proporcionar uma restrição natural da área plantada com um único cultivar, reduzindo riscos econômicos de perdas com possíveis epidemias (LANDELL; BRESSIANI, 2008). A resistência a doenças constitui o principal fator de substituição de cultivares na cana-de-açúcar (BRESSIANI, 2001), sendo o mosaico uma das principais doenças da cultura, com registros em quase todos os países produtores (GONÇALVES et al., 2012; VISWANATHAN; MOHANRAJ, 2001).

O mosaico da cana-de-açúcar causado pelo *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) é responsável por diversos impactos econômicos na cultura, com prejuízos desde a redução na eficiência fotossintética a reduções em vários parâmetros de crescimento e produção (VISWANATHAN; BALAMURALIKRISHNAN, 2005). Os sintomas iniciais de infecção, segundo Gonçalves et al. (2007), são caracterizados por pontos cloróticos de distribuição linear no meio ou mais comumente na base das folhas, que evoluem para áreas alongadas formando um mosaico típico, podendo aumentar de severidade com a idade da folha. Pode haver acentuada redução no crescimento das plantas dependendo da espécie e estirpe do vírus, do cultivar de cana-de-açúcar e da infecção ocorrer nos estágios iniciais de desenvolvimento da planta.

No Brasil, a doença encontra-se relativamente controlada com a ação dos programas de melhoramento e a adoção de práticas culturais como o *roguing* em viveiros, o uso de mudas sadias e o constante monitoramento de campos comerciais. No entanto, fatores como condições epidemiológicas favoráveis a

disseminação do mosaico e a descrição de novos isolados, como o SCMV Rib-1, responsável por surtos de mosaico em cultivares até então consideradas resistentes, reforçam a importância atual da doença no desenvolvimento de novos cultivares (GONÇALVES et al., 2004, 2007, 2012).

Apesar de sua importância, principalmente por ocasionar perdas significativas de produtividade em cultivares suscetíveis, poucos estudos foram realizados para a caracterização molecular da resistência da cultura da cana-de-açúcar ao SCMV. A identificação de fragmentos diferencialmente expressos (FDEs) no cultivar resistente durante o processo de infecção pelo SCMV pode sinalizar possíveis genes candidatos envolvidos em respostas de resistência.

Técnicas de análise de transcriptoma permitem o estudo de mudanças na expressão gênica, sendo a principal forma de caracterização de genes em cana-de-açúcar (MANNERS; CASU, 2011), uma vez que o sequenciamento completo de seu genoma ainda não foi obtido (OKURA et al., 2016). A técnica de cDNA-AFLP (“cDNA-amplified fragment length polymorphism”) tem sido considerada eficiente, sensível e com reprodutibilidade para o isolamento de genes diferencialmente expressos (BACHEM et al., 1996), a qual não requer o conhecimento prévio do genoma. Por este motivo ela vem sendo muito útil no estudo de novos genes em organismos não modelos (DURRANT et al., 2000; DITT et al., 2001; ZAGO et al., 2006) e oferece grande potencial em estudos de estresse biótico para o desenvolvimento de marcadores genéticos associados à resistência a pragas e doenças (BUTTERFIELD et al., 2004).

Diversas alterações na expressão gênica vêm sendo relacionadas aos fenômenos de metilação de DNA (SUZUKI; BIRD, 2008), interferência de RNA (RNAi; STORZ, 2002) e modificação de histonas e proteínas remodeladoras da cromatina (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011), fenômenos estes que são compreendidos pelo termo epigenética (FEIL; FRAGA, 2012). A investigação de alterações no padrão de metilação no genoma da cana-de-açúcar durante o processo de infecção pelo SCMV por meio da técnica MSAP (“Methylation Sensitive Amplified Polymorphism”) permite sua quantificação e identificação de possíveis genes afetados por essa via epigenética. A técnica vem sendo aplicada para

avaliação de variabilidade no padrão de metilação de populações selvagens, assim como para associações com função gênica por meio de técnicas de clonagem e sequenciamento dos polimorfismos observados (CICATELLI et al., 2014; MEDRANO et al., 2014).

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo dar continuidade a identificação de FDEs obtidos pela técnica cDNA-AFLP por Medeiros et al. (2014), assim como investigar a alteração no padrão de metilação e sua associação a genes por meio da técnica MSAP. A técnica MSAP foi aplicada em material vegetal procedente do experimento conduzido por Medeiros et al. (2014), onde dois cultivares de resposta contrastante ao mosaico foram inoculados com a estirpe agressiva de SCMV (estirpe Rib-1). Ambos os cultivares, IACSP95-5000 (resistente) e IAC91-1099 (suscetível), foram obtidos por micromeristemas, conduzidos em condições controladas de casa-de-vegetação e amostradas nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a inoculação.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Importância da cultura da cana-de-açúcar**

A cultura da cana-de-açúcar possui importância para produção de alimento e energia devido à sua capacidade de acúmulo de altos níveis de sacarose em seus colmos e alto rendimento, sendo uma das culturas de maior colheita total em toneladas (DAL-BIANCO et al., 2011). Em 2013, foram produzidas 1.900 milhões de toneladas de cana-de-açúcar em uma área de 26,5 milhões de hectares distribuídos nos diversos países produtores, sendo o Brasil o maior produtor mundial, com contribuição de 40,5% dessa produção (FAOSTAT, 2013). Segundo a CONAB (2016), a produção de cana-de-açúcar para a safra 2015/16 foi de 665,6 milhões de toneladas, com crescimento de 4,9% em relação à safra 2014/15, enquanto a área cultivada foi de 8,6 milhões de hectares, com redução de 3,9% em relação à safra

anterior. As regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste contribuíram para a redução na área cultivada, mas apresentaram aumentos na produtividade, enquanto a região Nordeste apresentou declínio na área destinada à produção e na produtividade. A região Norte, responsável por menos de 1% da produção nacional, apresentou aumento na área cultivada e redução na produtividade. Após o salto de produção de açúcar entre as safras 2005/06 e 2010/11, os valores permaneceram em torno de 38 milhões de toneladas até a safra 2013/14, ficando abaixo dos 35 milhões nas últimas duas safras, sendo a produção na safra 2015/16 de 33,49 milhões de toneladas, com redução de 5,8% em relação à safra anterior. Cinco estados contribuíram para essa redução, sendo eles Alagoas, São Paulo, Pernambuco, Paraná e Goiás. No estado de São Paulo, apesar do aumento na produção de cana-de-açúcar, o açúcar total recuperável (ATR) foi menor que o da safra anterior, o que acarretou em uma menor obtenção de subprodutos. Outros fatores que contribuíram para a redução na produção de açúcar foram o déficit hídrico nos estados de Alagoas e Pernambuco, e a produção de etanol em detrimento da de açúcar, no estado de Goiás. As contribuições das diferentes regiões para a produção de açúcar na safra 2015/16 foram nas proporções de 73,5% para a região Sudeste, 10,6% para a Região Centro-Oeste, 7,6% para a Região Nordeste, 8,1% para a região Sul e 0,1% para a Região Norte. A produção brasileira de etanol total no país na safra 2015/2016 foi de 30,5 bilhões de litros, com aumento de 6,3%, com contribuição das regiões Centro-Oeste, Sudeste e Norte para esse aumento. A produção de etanol é concentrada na Região Sudeste (59,3%), seguida pela Região Centro-Oeste (29%), Nordeste (5,6%), Sul (5,2%) e Norte (0,9%). Os aumentos na produtividade da cana-de-açúcar no Brasil devem-se principalmente a práticas culturais e ao melhoramento genético (CHEAVEGATTI-GIANOTTO, 2011), sendo o objetivo atual a seleção de clones com alta produtividade e teores de sacarose por hectare, mais rusticidade, como tolerância a seca, resistência a pragas e doenças e alta produção de etanol e biomassa (CESNIK; MIOCQUE, 2004; MORAIS et al., 2015).

## **2.2. Taxonomia da Cana-de-açúcar, origem e diversidade**

A cana-de-açúcar pertence ao gênero *Saccharum* L., tribo *Andropogoneae*, subfamília *Panicoideae*, família *Poaceae*. Espécies domesticadas e selvagens da tribo *Andropogoneae* representam importantes fontes de alimento, forragem, fibra e combustível, e incluem grandes culturas como milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*), além da cana-de-açúcar. Todas as espécies da tribo apresentam sistema fotossintético C<sub>4</sub>, que é caracterizado pela maior fixação de carbono e eficiência no uso de água e nutrientes em comparação a maioria das espécies vegetais (BEADLE; LONG, 1985; BROWN, 1978) contribuindo para as altas produtividades de biomassa observadas nas espécies cultivadas (SWAMINATHAN et al., 2010). Outra característica da tribo é a ampla distribuição do fenômeno da poliploidia levando a formação de genomas grandes e complexos. Mesmo apresentando distribuição tipicamente tropical e subtropical, as espécies de *Andropogoneae* cultivadas apresentam adaptação a uma diversidade de ambientes e variam quanto ao ciclo da cultura (anuais e perenes) e à forma cultivável de carbono (açúcar, amido de grãos ou celulose) (SWAMINATHAN et al., 2010).

Segundo Grivet et al. (2004), os recursos genéticos da cana-de-açúcar podem ser divididos nas categorias de cultivares tradicionais, acessos selvagens e cultivares modernos. Os cultivares tradicionais não apresentam mais expressão no ambiente de cultivo, sendo utilizados como progenitores dos cultivares modernos e fontes em potencial de caracteres de interesse para o melhoramento genético. Historicamente, os cultivares tradicionais descendem diretamente das primeiras domesticações por propagação clonal via toletes, abrangendo os cultivares nobres (*S. officinarum* L.,  $x = 10$ ,  $2n = 8x = 80$ ) (BREMER, 1961; D'HONT et al., 1995), os cultivares do Norte da Índia e os Chineses (BARBER, 1922). Os cultivares nobres possuem centro de diversidade em Nova Guiné e são caracterizados pelos altos teores de açúcar, enquanto os cultivares do Norte da Índia e os Chineses são caracterizados pela melhor adaptação ao clima tropical, número de cromossomos menor que 80 e teores de açúcar comparativamente menores (GRIVET et al., 2004). Cinco grupos morfo-citológicos foram descritos o subgrupo que abrange os cultivares do Norte da Índia e Chineses, sendo quatro deles incluídos na espécie *S. barberi* Jesw (Mungo, Saretha, Nargori e Sunnabile) e um incluído tanto na espécie

*S. barberi* Jesw ( $2n = 111-120$ ) como *S. sinense* ( $2n = 81-124$ ) Roxb (Pansahi) (BARBER, 1922; D'HONT et al., 1996).

Os acessos selvagens incluem *S. spontaneum* L ( $x=8$ ,  $2n=40$  e  $2n=128$ ), *S. robustum* Brandes e Jeswiet ex Grassl ( $x=10$ ,  $2n=60$  e  $2n=80$ ) (D'HONT et al., 1996, 1998; HA et al., 1999, GRIVET et al., 2004) e espécies do gênero *Erianthus*, *Miscanthus*, *Sclerostachya* e *Narenga*. Esses acessos selvagens, que são relacionados aos cultivares tradicionais de cana-de-açúcar e potencialmente incluídos entre seus progenitores (GRIVET et al., 2004), foram reunidos no grupo taxonômico informal 'complexo Saccharum', definido primeiramente por Mukherjee (1957) e estendido posteriormente por Daniels et al. (1975). O 'complexo Saccharum' representa a fonte de variação genética disponível para os programas de melhoramento. De acordo com D'Hont et al.(2002), *S. barberi* e *S. sinense* são híbridos interespecíficos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*, enquanto *S. edule* pode ser um híbrido interespecífico ou intergênero entre *S. officinarum* ou *S. robustum* com alguma espécie do 'complexo Saccharum' (DANIEL; ROACH, 1987). Segundo Irvine (1999), o nível de ploidia e número de cromossomos variam entre acessos de espécies do gênero *Saccharum*, com exceção para *S. officinarum*, resultando em diferentes tamanhos de genoma entre acessos e híbridos *Saccharum*.

Os cultivares modernos de cana-de-açúcar pertencem a um complexo de espécies aneuploides e poliploides (GRIVET; ARRUDA, 2002) obtidos por meio de complexas hibridações interespecíficas entre cultivares tradicionais e clones de *S. spontaneum* em cruzamentos artificiais, seguido de diversas gerações de seleção clonal (D'HONT et al., 1996). O conjunto cromossômico dos cultivares modernos ( $2n=100-130$ ) é estimado em consistir de 70-80% de *S. officinarum*, 10-20% de *S. spontaneum* e de aproximadamente 10% de recombinantes entre os genomas destas duas espécies (D'HONT et al., 1996). As espécies *S. sinense*, *S. barberi* e *S. robustum* também apresentam uma contribuição menor em alguns cultivares modernos de cana-de-açúcar (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). A base genética dos cultivares modernos é caracterizada pelo estreitamento devido ao uso de um pequeno número de clones *S. officinarum* e *S. spontaneum* nos primeiros cruzamentos interespecíficos (ARCENAU, 1967), sendo sua maioria descendente

desses clones (BERDING; ROACH, 1987; DEREN, 1995). O estreitamento da base genética também tem sido observado nos programas de melhoramento do Brasil, onde se utilizam de forma preponderante cultivares comerciais como parentais, os quais possuem uma base genética comum (BARBOSA, 2001; DUARTE FILHO et al., 2010). Dessa forma, programas de introgressão com acessos selvagens vêm sendo desenvolvidos para ampliar a base genética da cultura, assim como para seleção de genótipos com foco na produção de biomassa para produção de etanol e energia (BARBOSA et al., 2004).

### **2.3. Doenças da cana-de-açúcar**

Atualmente, 216 doenças foram descritas em cana-de-açúcar sendo 10 consideradas como de grande impacto econômico, sendo elas mosaico, carvão, raquitismo da soqueira, escaldadura, ferrugem, amarelinho, podridão vermelha, estrias vermelhas, podridão abacaxi e mancha parda (SANGUINO, 2012; MORAIS et al., 2015).

O manejo de doenças na cultura da cana-de-açúcar consiste principalmente na integração entre resistência genética e práticas culturais como medidas de quarentena, *roguing* em viveiros e o constante monitoramento de campos comerciais. Alguns cultivares são suscetíveis a mais de um patógeno e muitos clones elite de alta produção não são liberados comercialmente devido a suscetibilidade a patógenos. Desta forma, existe uma constante necessidade de manter e introduzir genes de resistência em clones cultivados assim como em germoplasma de cana-de-açúcar com potencial para o melhoramento (LAKSHMANAN et al., 2005).

Os primeiros híbridos interespecíficos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum* e o subsequente processo de nobilitação caracterizaram os primeiros avanços no cultivo da cana-de-açúcar. O processo de nobilitação consistiu de retrocruzamentos sucessivos com *S. officinarum*, e os avanços obtidos consistiram no controle de algumas doenças via transferência de genes de resistência, assim como aumentos

na produtividade, no perfilhamento e na adaptação a estresses abióticos (ROACH, 1972). Um dos grandes avanços do melhoramento convencional consistiu na obtenção de clones resistentes ao raquitismo de soqueira e ferrugem (MORAIS et al., 2014).

#### **2.4. Biotecnologia e o melhoramento da cana-de-açúcar**

A aplicação de ferramentas da biologia molecular pode fornecer alternativas às limitações do melhoramento clássico, a exemplo do emprego de marcadores moleculares nos estudos genéticos em culturas de genoma complexo como a cana-de-açúcar. O sequenciamento de genomas vegetais geralmente é desafiador devido à arquitetura complexa e alto conteúdo de sequências repetitivas, sobretudo para os híbridos de cana-de-açúcar, com mais de 55% de sequências repetitivas (OKURA et al., 2016), nível de ploidia superior a 10 e o genoma de 10 Gb, a exemplo do cultivar R570 (D'HONT; GLASZMANN, 2001; LE CUNFF et al., 2008). Esta complexa arquitetura genômica com diversos homo/homeoalelos em cada locus (DAUGROIS et al., 1996; GUIMARAES et al., 1999) dificulta a montagem do genoma por meio da técnica de sequenciamento “shotgun”, devido à sobreposição de leituras provenientes dos homeoalelos que impede a recuperação de grandes “contigs”. O sequenciamento completo do genoma da cana-de-açúcar ainda não foi alcançado e algumas regiões do genoma consenso obtidas podem apresentar um mosaico de sequências com significado biológico comprometido (OKURA et al., 2016). Como alternativa tem-se realizado sequenciamentos de bibliotecas de cromossomos artificiais de bactérias (“Bacterial Artificial Chromosome”, BAC) e posteriores alinhamentos usando o genoma de sorgo como modelo sintênico de modo a fornecer mapas de referência que permitem o melhor entendimento da organização genômica da cana-de-açúcar (PATERSON et al., 2009; DE SETTA et al., 2014; OKURA et al., 2016), pois alinhamentos parciais de regiões sobrepostas de grandes contigs possibilitam a representação de diferentes segmentos cromossômicos homólogos/homeólogos. Os gêneros *Saccharum* e *Sorghum* compartilham diversas

similaridades em sua composição genética, uma vez que se originaram de um ancestral comum aproximadamente 5-8 milhões de anos atrás (Al-JANABI et al., 1994; GUIMARÃES et al., 1997; FIGUEIRA et al., 2008) de forma que possui amplo reconhecimento como genoma de referência para análises comparativas, auxiliando a compreensão do genoma da cana-de-açúcar (SWAMINATHAN et al., 2010).

Devido à falta de um genoma completamente sequenciado, a caracterização de genes de cana-de-açúcar e sua associação com caracteres biológicos como acúmulo de açúcar, produção de biomassa e tolerância a estresses tem se baseado em estudos de transcriptoma (MANNERS; CASU, 2011). Diversas técnicas que permitem o estudo das alterações no transcriptoma estão presentes na literatura, tendo-se como exemplos macroarranjos (SCHENA et al., 1995), microarranjos (AHARONI; VORST, 2002), análise de diferenças representativas (“representational difference analysis”, RDA) (HUBANK; SCHATZ, 1994), hibridização subtrativa supressiva (“suppression subtractive hybridization”, SSH) (DIATCHENKO et al., 1996), cDNA-AFLP (BACHEM; OOMEN; VISSER, 1998), análise serial da expressão gênica (“serial analysis of gene expression”, SAGE) (YAMAMOTO et al., 2001) e RNA-seq (GRABHERR et al., 2011).

O sequenciamento de marcadores de sequência expressa (“expressed sequence tags”, ESTs) tem contribuído para o processo de descoberta de genes em cana-de-açúcar (HOTTA et al., 2010), havendo iniciativas de desenvolvimento de coleções ESTs por grupos de pesquisa na África do Sul (CARSON; BOTHA, 2000), Austrália (CASU et al., 2003), Estados Unidos (MA et al., 2004), e pela iniciativa da SUCEST no Brasil (VETTORE et al., 2003). Segundo Dal-Bianco et al. (2010), a base de dados SUCEST-FUN integra o projeto EST de cana-de-açúcar (SUCEST) (VETTORE et al., 2003), o índice de genes de cana-de-açúcar (“Sugarcane Gene Index”, SGI), dados de expressão gênica (PAPINI-TERZI et al., 2005; ROCHA et al., 2007; PAPINI-TERZI et al., 2009; WACLAWOVSKY et al., 2010), a base de dados GRASSIUS (YILMAZ et al., 2005) e registros de características agrônômicas, fisiológicas e bioquímicas de cultivares de cana-de-açúcar (<http://sucest-fun.org>). A coleção SUCEST abrange 26 bibliotecas cDNA obtidas de raiz, plântulas, colmos, folhas, flores e sementes, assim como calos submetidos a estresses abióticos e

plântulas submetidas a infecção com bactérias fixadoras de nitrogênio endofíticas, que permitem uma abordagem global da expressão gênica em cana-de-açúcar (VETTORE et al., 2003). A coleção contém 237.954 ESTs agrupados em 43.141 transcritos montados, 32.848 proteínas preditas e 68.383 pontos de dados de expressão gênica diferencial (NISHIYAMA et al., 2010).

Os estudos envolvendo a caracterização de genes descobertos por meio de ESTs foram realizados principalmente por meio de análises de padrões de macro e micro arranjos e PCR quantitativo (HOTTA et al., 2010). Uma limitação das metodologias de arranjo se encontra na aplicação restrita a sequências já identificadas (YAMAMOTO et al., 2001).

A técnica cDNA-AFLP, por sua vez, possui a vantagem de não requerer conhecimentos prévios de sequência para sua aplicação. Diferentemente das técnicas de arranjo, ela oferece poucas informações para um cenário mais amplo da reprogramação gênica (MANNERS; CASU, 2011), mas têm apresentado relevante aplicação na identificação de genes candidatos para diversas condições (DINARI et al., 2013; BASTIAANSE et al., 2014; EBADZAD; CRAVADOR, 2014; GUO et al., 2014).

## 2.5. Mosaico da cana-de-açúcar

O *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), agente causal do mosaico da cana-de-açúcar, pertence ao gênero *Potyvirus*, da família *Potyviridae*. A família *Potyviridae* é a segunda maior dentre os fitovírus, depois da *Geminiviridae*, com um total de 203 espécies distribuídas em oito gêneros de vírus: *Potyvirus*, *Brambyvirus*, *Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Poacevirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus*, sendo o gênero *Potyvirus* o mais abrangente, com 146 espécies (ROOSSINCK, 2012; VALLI et al., 2015 ). A doença do mosaico em membros da família *Poaceae* é causada por diferentes vírus pertencentes ao subgrupo do SCMV, incluindo seis espécies do gênero *Potyvirus* (SCMV; *Sorghum mosaic virus*, SrMV; *Johnsongrass mosaic virus*, JGMV; *Maizedwarf mosaic virus*, MDMV; *Pennisetum*

*mosaic virus*, PenMV; *Zea mosaic virus*, ZeMV) e uma do gênero *Poacevirus* (*Sugarcane streak mosaic virus*, SCSMV). Em condições naturais apenas o SCMV, SrMV e SCSMV infectam a cana-de-açúcar (CHATENET et al., 2005), sendo que no Brasil apenas o SCMV foi relatado (GONÇALVES et al., 2007).

A doença é responsável por diversos impactos econômicos na cultura da cana-de-açúcar, promovendo reduções em parâmetros de crescimento e produção, além de alterações nas propriedades do caldo extraído. Viswanathan e Balamuralikrishnan (2005) ao compararem colmos dos cultivares Co 740 e CoC 671 nas condições de ausência e presença de infecção por SCMV, observaram reduções na germinação de colmos, produção de perfilho e assimilação líquida de CO<sub>2</sub>, a qual representa redução na taxa de fotossíntese. Os parâmetros de produção como diâmetro de colmo, número de internódios e peso de colmo também apresentaram redução juntamente com as propriedades do caldo extraído como brix, polaridade, pureza e sobrenadante livre de células (“cell free supernatants”, CCS). As espécies SCMV e SrMV representam os vírus mais disseminados na cultura e uma ameaça potencial à agroindústria (PERERA et al., 2009). Os sintomas iniciais de infecção, segundo Gonçalves et al. (2007), são caracterizados por pontos cloróticos de distribuição linear no meio ou mais comumente na base das folhas, que evoluem para áreas alongadas formando um mosaico típico, podendo aumentar de severidade com a idade da folha. Pode haver acentuada redução no crescimento das plantas dependendo da espécie e estirpe do vírus, do cultivar de cana-de-açúcar e do estágio de desenvolvimento da planta quando ocorre a infecção, com maior severidade em estágios iniciais.

A transmissão dos vírus do subgrupo do SCMV se dá por meio de várias espécies de afídeos, com destaque para *Rhopalosiphum maidis* e *Schizaphis graminum* (TEAKLE et al., 1989), encontrados frequentemente em várias culturas do Brasil (GONÇALVES et al., 2007) (Figura 1). A transmissão ocorre de forma não persistente, com períodos de acesso de aquisição e de transmissão de poucos segundos a minutos, e retenção por até algumas horas, a exemplo do SCMV MDB (SHUKLA et al., 1994).

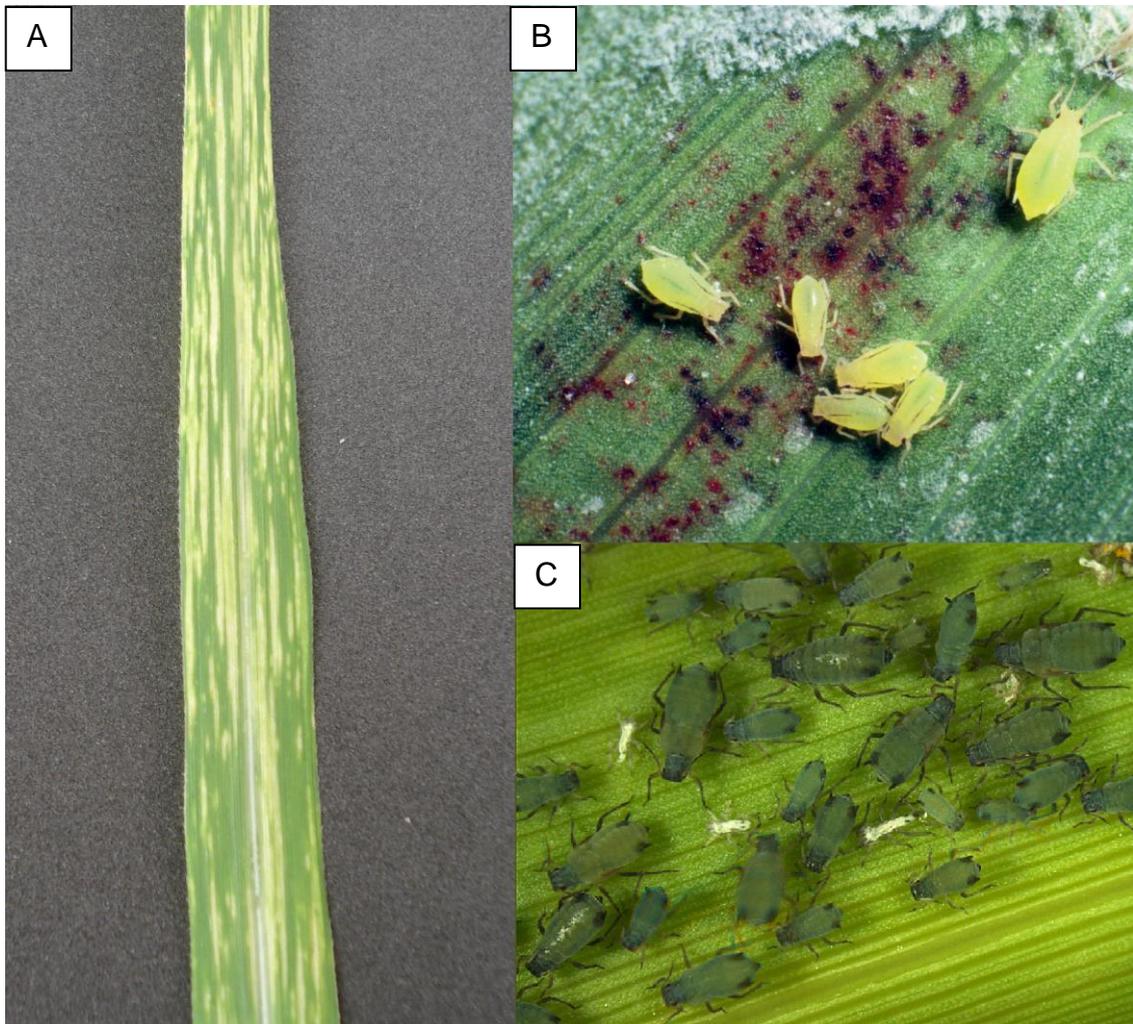


Figura 1. Sintomas de mosaico da cana-de-açúcar e os principais vetores da doença. A: Sintoma severo de mosaico após inoculação mecânica com SCMV Rib-1 do cultivar IACSP97-4039. B: Adultos de *Schizaphis graminum* infestando *S. bicolor* (SPARKS, 2004). C: Infestação ocasionada por *Rhopalosiphum maidis* (fonte: <http://www.nbair.res.in/Aphids/Rhopalosiphum-maidis.php>).

Devido à transmissão não persistente, o controle químico dos vetores não é efetivo no controle da doença (GONÇALVES et al., 2012). O controle e a prevenção de infecções por *Potyvirus* são dificultados pelo comportamento de migração dos afídeos, juntamente com o fato de que cada espécie de *Potyvirus* pode ser transmitida por muitas espécies de afídeos, ao passo que cada espécie de afídeo pode transmitir diversas espécies de *Potyvirus* (GIBBS et al., 2008; IVANOV et al.,

2014). No Brasil, a doença se encontra relativamente controlada com a ação dos programas de melhoramento e a adoção de práticas culturais como o *rouging* em viveiros, o uso de mudas saudáveis e o constante monitoramento de campos comerciais (GONÇALVES et al., 2012). No entanto, fatores como condições epidemiológicas favoráveis a disseminação do mosaico e a descrição de novos isolados, como o SCMV Rib-1, responsável por surtos de mosaico em cultivares considerados resistentes, até o seu surgimento, reforçam a importância atual da doença no desenvolvimento de novos cultivares (GONÇALVES et al., 2007, 2012).

A infecção por *Potyvirus* envolve processos moleculares complexos em vários compartimentos celulares, requerendo a participação de diversos genes e proteínas por parte do hospedeiro, sendo muitos aspectos não esclarecidos acerca do mecanismo de supressão das defesas do hospedeiro e da criação de um ambiente intracelular ótimo para a tradução do genoma viral (IVANOV et al., 2014). Um melhor entendimento da interação entre proteínas de *Potyvirus* e hospedeiro tem sido possível por meio de análises de transcriptoma (AGUDELO-ROMERO et al., 2008; BABU et al., 2008; BAEBLER et al., 2009), proteoma (YANG et al., 2011; WU et al., 2013), metaboloma (PRASCH; SONNEWALD, 2013) e interactoma (ELENA; RODRIGO, 2012; MARTÍNEZ et al., 2016).

O estudo de microarranjos de cDNA realizado por Baebler et al. (2009) com dois cultivares de batata de resposta contrastante a estirpe necrótica de *Potato virus Y* (PVY) revelou alterações em transcritos relacionados a fotossíntese, percepção de sinais, e defesa vegetal por meio de compostos secundários e inibidores de proteinase. No cultivar suscetível foi observada a regulação positiva de transcritos relacionados à sinalização e à fatores de transcrição da família WRKY, enquanto no cultivar resistente foi observada regulação positiva de transcritos relacionados à síntese de compostos secundários e resposta a estresses bióticos. Em *Arabidopsis thaliana* sob infecção com outro *Potyvirus*, o *Plum pox virus* (PPV), Babu et al. (2008) observaram regulação negativa de genes relacionados a desenvolvimento/armazenamento de proteínas, síntese proteica e tradução de genes relacionados à parede celular, enquanto uma regulação positiva foi observada para genes envolvidos em açúcares solúveis, aminoácidos, organelas intracelulares

ligadas a membrana, cloroplastos e destinação de proteínas. A expressão diferencial destes genes foi associada à infecção por PPV e ao desenvolvimento de sintomas, enquanto o perfil de protoplastos de *A. thaliana* transfectados com PPV revelou uma regulação negativa mais proeminente que a regulação positiva nos primeiros estágios de infecção e a concomitante indução e alta representação de genes relacionados à defesa, sinalização celular, metabolismos primário e secundário, transcrição e transporte com possível função em vias de transdução de sinais responsáveis pela indução de resistência a PPV, sendo alguns exemplos proteínas da família *zinc finger* e da família de fatores de transcrição WRKY (BABU et al., 2008). A interação entre vias de sinalização de estresses abióticos e bióticos tem sido observada na literatura (KNIGHT; KNIGHT, 2001; SMEKALOVA et al., 2014). Agudelo-Romero et al. (2008) observaram que o *Potyvirus Tobacco etch virus* (TEV) ativou genes de *A. thaliana* que também são induzidos por estresses abióticos, como seca, salinidade, altas temperaturas e injúria mecânica.

Em análises de proteoma de milho sob infecção com SCMV, Wu et al. (2013) observaram 93 proteínas responsivas a infecção viral, envolvidas principalmente em vias de energia e metabolismo, resposta a estresses e em vias de defesa, fotossíntese e fixação de carbono, com localização predominante no cloroplasto e citoplasma. Yang et al. (2011) observaram 28 proteínas diferencialmente expressas em soja sob infecção com outro *Potyvirus*, o *Soybean mosaic virus* (SMV), envolvidas na síntese e degradação de proteínas, sinalização, defesa a doenças e regulação do metabolismo energético.

Elena e Rodrigo (2012) realizaram uma abordagem sistêmica das interações entre os componentes do hospedeiro e de *Potyvirus* em *A. thaliana* mediante análises de interactoma. Isso foi realizado por meio da integração de informações de diversas fontes referentes a interações físicas entre proteínas de *Potyvirus* e *A. thaliana*, e demonstraram que as proteínas virais P3 e VPg interagem com as proteínas do hospedeiro Rbcs e OBE-1. Essas proteínas de hospedeiro se caracterizam por serem altamente conectadas a outras proteínas, apresentando 23 e 27 interações, respectivamente, podendo ser definidas como proteínas 'hub'. Segundo os autores, isso sugere a ocorrência de uma perturbação de todo o

proteoma hospedeiro durante a infecção, por meio de interações diretas na tradução, degradação e dobramento proteicos. Apesar da tendência das proteínas alvo de vírus serem 'hub' no interactoma hospedeiro (DE CHASSEY et al., 2008; PICHLMAIR et al., 2012), Martínez et al. (2016) ao analisarem proteínas de *A. thaliana* alvos da proteína NIa de clones construídos de TEV, por meio de marcação de um de seus dois domínios, VPg ou NIaPro, e purificação por afinidade seguida de análise por espectrometria de massa ("affinity purification followed by mass spectrometry analysis", AP-MS) do tecido infectado, observaram que os alvos de NIa não apresentaram número de conexões significativas para serem consideradas 'hub', mas apresentaram posicionamento que permite a conexão com outras proteínas hospedeiras por vias curtas. Segundo os autores, as proteínas alvo de NIa estão envolvidas principalmente em respostas a estresse, metabolismo, fotossíntese e localização, estando muitas conectadas a vias de sinalização pelo fitormônio etileno.

Diferentemente dos avanços alcançados em outras espécies vegetais, existem poucas informações na literatura sobre os mecanismos moleculares da interação entre *Potyvirus* e a cultura da cana-de-açúcar. Um exemplo consiste na investigação do transcriptoma em cana-de-açúcar realizada por meio da técnica cDNA-AFLP em cultivares de resposta contrastante ao SCMV por Medeiros et al. (2014). Os autores identificaram FDEs com similaridade a elementos transponíveis, transcritos de proteína relacionada à patogênese ("Pathogenesis Related", PR) e sinalização de defesa.

## **2.6. Interação patógeno-hospedeiro**

A defesa contra organismos potencialmente patogênicos em espécies vegetais consiste em respostas imunes inatas de cada célula vegetal e em sinais sistêmicos originados dos sítios de infecção, não existindo especialização celular para esse propósito (THOMMA et al., 2011). A imunidade inata pode ser dividida em dois ramos principais de acordo com o tipo e localização do receptor, da molécula

detectada e dos componentes de sinalização subsequentes (DODDS; RATHJEN, 2010).

O primeiro ramo consiste no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (“pathogen-associated molecular patterns”, PAMPs) por meio de receptores transmembrana de reconhecimento de padrão (“pattern recognition receptors”, PRRs). Os PAMPs são originalmente definidos como moléculas altamente conservadas evolutivamente em uma determinada classe de microrganismo com funções essenciais para o valor adaptativo ou sobrevivência (MEDZHITOV; JANEWAY, 1997; NURNBERGER; BRUNNER, 2002), estando presente também em microrganismos não patogênicos, o que leva ao uso do termo alternativo na literatura de padrões moleculares associados a micróbios (“microbe-associated molecular patterns”, MAMPs) (BOLLER; FELIX, 2009).

Após o reconhecimento, a subsequente transdução de sinais dentro da célula ocorre por meio de cascatas de fosforilação, ocasionando reações conhecidas como defesas basais ou imunidade induzida por PAMP (“PAMP-triggered immunity”, PTI), tendo-se como exemplo a produção de espécies reativas de oxigênio (“reactive oxygen species”, ROS), óxidos nítricos, ativação de proteínas kinases induzidas por substâncias mitógenas (MONAGHAN; ZIPFEL, 2012; BIGEARD; COLCOMBET; HIRT, 2015), espessamento de paredes celulares, síntese de ácido salicílico e sinalização, além da reprogramação transcricional (BIGEARD; COLCOMBET; HIRT, 2015). Dentre as moléculas derivadas de patógenos, têm-se como exemplo a proteína estrutural de flagelo bacteriano, flagelina e o polissacarídeo quitina, presente nas paredes celulares de fungos, encontrados nos espaços apoplásticos.

O segundo ramo da imunidade vegetal compreende o reconhecimento de efetores gerados pelos patógenos, que são moléculas responsáveis pela interação com proteínas intracelulares do hospedeiro para disponibilizar nutrientes ou para inibir respostas de defesa, que ocorrem principalmente por meio de receptores imunes intracelulares denominados de proteínas ligantes a nucleotídeos, ricas em repetições de leucina (“nucleotide-binding leucine-rich repeat”, NB-LRR). Esse processo é conhecido como imunidade induzida por efetores (“effector-triggered immunity”, ETI) que envolve vias de defesa ainda pouco conhecidas (DODDS;

RATHJEN, 2010; DANGL; HORVATH; STASKAWICZ, 2013). Essa via de sinalização é caracterizada pela especificidade em nível de estirpe ou raça do patógeno e é associada a respostas como morte celular programada, definida como uma resposta de hipersensibilidade (“hyper-sensitive response”, HR), e também à resistência sistêmica adquirida do hospedeiro (“systemic acquired resistance”, SAR) (THOMMA; NURNBERGER; JOOSTEN, 2011).

Jones e Dangl (2006) propuseram o modelo ‘zig-zag’, que ilustra em quatro fases o processo evolutivo da relação entre patógeno e hospedeiro. Na primeira fase, a infecção é prevenida por meio da defesa basal ou PTI. Na segunda fase, patógenos bem sucedidos liberam efetores que interferem com as defesas basais ou que permitem sua nutrição e dispersão, ocasionando a suscetibilidade induzida por efetores (“effector-triggered susceptibility”, ETS). Na terceira fase ocorre o reconhecimento de um dos efetores por uma proteína NB-LRR, ocasionando a ETI e a prevenção do processo infeccioso. Na quarta fase, a pressão de seleção ocasiona a predominância de isolados que não possuam o efector reconhecido pelo hospedeiro e até ao ganho de novos efetores via fluxo gênico horizontal, de forma a inibir a ETI (STAVRINIDES; MCCANN; GUTTMAN, 2008; DONG et al., 2014). Essa circunstância favorece a seleção de novos alelos do hospedeiro capazes de reconhecer os novos efetores, promovendo novamente a ETI (KASCHANI et al., 2010; RAVENSDALE et al., 2010). Dentre os mecanismos responsáveis pela evolução dos receptores vegetais encontram-se mutações, duplicações e rearranjos gênicos (MEYERS, 2003; JOSHI; NAYAK, 2013). Evidências recentes têm apontado para um cenário mais complexo para o sistema imune vegetal que o proposto pelo modelo ‘zig-zag’, sugerindo a existência de uma transição contínua entre PAMPs e efetores, PRR e proteínas R e, deste modo, entre PTI e ETI (THOMMA; NURNBERGER; JOOSTEN, 2011).

Os vírus geralmente não são vistos como responsáveis pela codificação de PAMPs e efetores, sendo excluídos na maioria dos modelos de imunidade vegetal PTI e ETI (JONES; DANGL, 2006; BOLLER; FELIX, 2009; DANGL; SCHWESSINGER; RONALD, 2012; HORVATH; STASKAWICZ, 2013). Evidências recentes reunidas na revisão de Nicaise (2014) demonstram casos de

reconhecimento de elementos virais por proteínas hospedeiras NBS-LRR que desencadeiam reações como HR e SAR, sugerindo mecanismos antivirais ETI. Já a presença de um padrão molecular conservado nos motivos protéicos dos vírus, cujo genoma é altamente variável, é de difícil aplicação, no entanto a presença de características estruturais únicas nos genomas virais e em suas formas replicativas pode permitir seu reconhecimento pelo hospedeiro e atuar como um PAMP viral (NICAISE, 2014). Mais recentemente, Nicaise e Candresse (2016) observaram regulação de genes PTI em *Arabidopsis* em resposta ao *Potyvirus Plum pox virus* (PPV) e efeitos repressores na expressão desses genes, trabalhando com a expressão *in planta* de CP-GFP (proteína capsidial viral fusionada a GFP). Os autores levantaram a hipótese que a infecção por PPV induz mecanismos PTI que são posteriormente reprimidos pela proteína viral CP, um possível efetor, para promover a colonização do hospedeiro.

Segundo Nicaise (2014), as vias de defesa de espécies vegetais a vírus se baseiam em genes R (resistência dominante), na ausência de fatores favoráveis ao vírus no hospedeiro (resistência recessiva), na regulação de redes de sinalização por fitormônios e na interferência de RNA (“RNA interference”, RNAi). A maioria dos genes de resistência de herança dominante (genes R) identificados na interação de espécies vegetais com vírus pertence à classe de sítios NB-LRR (NBS-LRR) que reconhecem especificamente os produtos gênicos virais estabelecendo a interação definida como gene a gene. Diversas proteínas NB-LRR que conferem resistência a vírus foram descritas e classificadas com base na estrutura N-terminal, que pode carregar um receptor “Toll-interleukin-1” (TIR) ou domínio “coiled-coin” (CC) (MOFFETT, 2009; DE RONDE et al., 2014).

Dentre as proteínas CC-NBS-LRR, um dos exemplos mais bem caracterizados é o gene Rx1 da cultura da batata, responsável por mediar à resistência ao vírus *Potato potexvirus X* (PVX) por meio do reconhecimento da proteína capsidial (CP) (RAIRDAN et al., 2008; HAO et al., 2013). Das proteínas TIR-NBS-LRR, o fator N (“N factor”), descrito em *Nicotiana tabacum*, interage com o domínio replicase do *Tobacco mosaic tobamovirus* (TMV) de forma dependente de ATP (UEDA et al., 2006). Exemplos de genes de resistência não pertencentes à

classe NB-LRR incluem os genes RTM (“Restricted TEV Movement”) observados em interações com vírus do gênero *Potyvirus* como *Tobacco etch virus* (TEV), *Lettuce mosaic virus* (LMV), e *Plum pox virus* (PPV) (COSSON et al., 2012).

Segundo Diaz-Pendon et al. (2004), dos 200 genes de resistência a vírus descritos em espécies vegetais, aproximadamente metade apresenta herança recessiva. Essa proporção sugere que genes de herança recessiva são mais importantes na resistência de plantas a vírus do que a outros patógenos, havendo vários exemplos de clonagem de genes com esse padrão de herança em espécies cultivadas. Estes genes demonstraram funções na codificação de fatores de iniciação eucarióticos (“eukaryotic initiation factors”, eIFs), pertencendo às famílias eIF4E e eIF4G (TRUNIGER; ARANDA, 2009; WANG; KRISHNASWAMY, 2012; JULIO et al., 2014; NICAISE, 2014; REVERS; NICAISE, 2014). Esses fatores recrutam mRNAs e ribossomos antes do processo de tradução (PESTOVA et al., 2001) e são preditos como fatores de suscetibilidade que são recrutados durante a tradução e replicação do genoma viral (NICAISE, 2014).

Os genes pertencentes às famílias eIF4E e eIF4G se destacaram inicialmente pela associação com infecções bem sucedidas por vírus do gênero *Potyvirus*. Posteriormente, encontraram-se indícios de participação de um mecanismo mais amplo de suscetibilidade vegetal à vírus após a descrição de funções para outros gêneros como *Bymovirus*, *Cucumovirus*, *Ipomovirus*, *Sobemovirus*, *Carmovirus* e *Waikivirus* (REVERS; NICAISE, 2014). Genes desta família possuem o aspecto de abranger uma ampla variedade de resistência fenotípica, de resistência completa qualitativa a resistência parcial e poligênica (CARANTA et al., 1997; NICAISE et al., 2003; ACOSTA-LEAL; XIONG, 2008; CHARRON et al., 2008).

Genes de resistência de herança recessiva que não codificam fatores de iniciação também foram identificados, tendo-se como exemplos a proteína similar a dissulfeto isomerase (“Protein disulfide isomerase like 5-1”, PDI5-1) para resistência a *bymovirus* em cevada (YANG et al., 2014), o gene bloqueador de transporte vascular caracterizado em batata *ra* contra o *Potato virus A* (PVA), do gênero *Potyvirus*, (HÄMÄLÄINEN et al., 2000) e o gene *rwm1* que confere resistência em *Arabidopsis* ao *Watermelon mosaic virus*, também do gênero *Potyvirus*, que atua

nos estágios iniciais da infecção, prejudicando o acúmulo de partículas virais (OUIBRAHIM et al., 2014).

Os hormônios vegetais, ou fitormônios, possuem importantes funções na sinalização da defesa, apresentando alterações na quantidade, composição e balanço frente ao ataque de um patógeno. Os principais fitormônios envolvidos em vias de defesa são ácido salicílico (“salicylic acid”, SA), ácido jasmônico (“jasmonic acid”, JA), etileno e ácido abscísico (“abscisic acid”, ABA). O acúmulo endógeno de SA em infecções virais é necessário para a manutenção da SAR, resultando na reprogramação transcricional de um conjunto de genes codificantes de proteínas relacionadas à patogênese (“pathogenesis-related”, PR) (TSUDA et al., 2008; YI et al., 2014). As respostas de HR ocasionadas por infecções virais, por sua vez, alteram o balanço hormonal entre SA e JA (NICAISE, 2014), que é essencial na determinação do nível de resistência genética de forma similar a outros patossistemas envolvendo patógenos não-virais (THALER et al., 2012). Os efeitos de JA na resistência vegetal a vírus são controversos, apresentando regulação negativa da resistência localizada em fumo ao TMV (OKA et al., 2013) enquanto tem demonstrado papel essencial na resistência sistêmica ao TMV em *Nicotiana benthamiana* (ZHU et al., 2014). Outros hormônios com efeitos regulatórios na resistência vegetal a vírus são ABA (CHEN et al., 2013; ALAZEM et al., 2014; SEO et al., 2014), etileno (LOVE et al., 2007; CHEN et al., 2013) e brassinosteróide (ALI et al., 2014).

Segundo Alazem e Lin (2015), as vias alteradas por infecções virais são amplas e sobrepostas, abrangendo alterações em fitormônios, metabólitos, no perfil transcricional e no perfil de pequenos RNAs. Vias baseadas em RNAi têm evidenciado um sistema antiviral muito eficiente direcionado a agentes infecciosos em nível de ácido nucléico (AGRAWAL et al., 2003; NICAISE, 2014). RNAi é um termo abrangente que descreve um sistema regulatório específico a sequências que leva ao silenciamento gênico tanto pela repressão da transcrição (“transcriptional gene silencing”, TGS) como pela degradação do transcrito ou repressão da tradução (“post transcription gene silencing”, PTGS) (AGRAWAL et al., 2003; MATZKE; MOSHER, 2014). A PTGS em vírus se baseia no reconhecimento de seus RNAs

codificados por meio de proteínas como RNA polimerase dependente de RNA (“RNA-dependent RNA polymerase”, RDR) e proteínas similares a Dicer (“Dicer-like”, DCL) para a geração de pequenos RNAs interferentes (“small interfering RNAs”, siRNA) os quais são incorporados ao complexo RISC (“RNA-induced cytoplasmic silencing complex”) que realiza a clivagem adicional de RNAs virais complementares aos siRNAs, de modo a limitar a replicação e disseminação viral (RUIZ-FERRER; VOINNET, 2009). A TGS consiste na geração de siRNA a partir de transcritos de uma região genômica a ser silenciada, desencadeando em modificações epigenéticas repressivas, como metilação de DNA e de histonas, nas regiões do genoma homólogas a estes siRNA (MATZKE; MOSHER, 2014), sendo os vírus com genoma de DNA também sujeitos à TGS, uma vez que também geram pequenos RNAs (RUIZ-FERRER; VOINNET, 2009). Vias envolvendo fenômenos epigenéticos têm demonstrado importante função em espécies vegetais durante a infecção viral, a exemplo da correlação entre metilação de DNA e remodelação da cromatina com a manutenção da SAR (SPOEL; DONG, 2012).

## **2.7. Epigenética e padrões de metilação**

Estudos anteriores têm demonstrado diversas alterações na expressão gênica envolvendo processos como metilação de DNA (SUZUKI; BIRD, 2008), interferência de RNA (RNAi) (STORZ, 2002) e modificação de histonas e proteínas remodeladoras da cromatina (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011). Essas alterações formam um sistema que promove a regulação gênica e a adaptabilidade a estímulos externos, de natureza biótica ou abiótica, de forma independente de modificações na sequência de DNA, sendo conhecidas, em um sentido amplo, como epigenética (FEIL; FRAGA, 2012). Os processos de RNAi e modificações de histonas remodeladoras de cromatina apresentam estreita ligação com a metilação de DNA, sendo um exemplo a via da metilação direcionada por RNA (“RNA-directed DNA methylation”, RdDM), onde siRNAs promovem modificações epigenéticas repressivas como metilação de DNA e de histonas em regiões homólogas do

genoma, podendo desencadear a herança epigenética (RAPP; WENDEL, 2005; RICHARDS, 2011; MATZKE; MOSHER, 2014).

A estrutura da cromatina, resultante da interação entre a molécula de DNA e as proteínas histonas, influencia a transcrição por tornar o DNA mais ou menos acessível. Diferentes modificações pós-traducionais de proteínas histonas, que consistem na adição covalente de diferentes grupos químicos a resíduos particulares, principalmente na cauda das histonas, influenciam a estrutura local da cromatina com efeitos tanto positivos como negativos na expressão gênica. A associação entre modificações de histona e estado funcional da cromatina está bem estabelecida, a exemplo da trimetilação no resíduo de lisina 4 da histona 3 (H3K4me3), que está relacionada a genes ativos, enquanto a trimetilação no resíduo de lisina 9 (H3K9me3) é característica de cromatina em estado reprimido (RAPP; WENDEL, 2005; GÓMEZ-DÍAZ et al., 2012). Contudo, a extensão das relações de causa e efeito entre os fenômenos de metilação de DNA e modificação de histonas nas alterações na expressão gênica ainda não é conhecida (MEDVEDEVA et al., 2013; ROSE; KLOSE, 2014; SCHÜBELER, 2015).

A metilação de DNA ocorre por meio da adição covalente de um grupo metil ao carbono 5' da citosina, sendo um processo catalisado enzimaticamente que promove alterações no processo de transcrição ou estrutura da cromatina. A distribuição genômica da metilação de DNA e sua prevalência variam amplamente entre os clados, sugerindo modos de direcionamento e função distintos (SCHÜBELER, 2015).

Em vertebrados, a metilação de DNA ocorre exclusivamente no motivo CpG e sua distribuição é generalizada pelo genoma, indicando ser este um estado padrão. No decorrer do tempo evolutivo, os dinucleotídeos CpG são perdidos devido ao processo de deaminação da citosina metilada em timina, uma base adequada para genoma, ao invés da uracila, resultando em uma ineficiência do processo de reparo por excisão de bases no DNA metilado. As ilhas CpG são uma exceção para essa perda generalizada por permanecerem hipometiladas e são caracterizadas por coincidir com regiões promotoras (SCHÜBELER, 2015). Em plantas, a metilação é comumente detectada em sítios de sequência CpG, CpHpG e CpHpH (com H sendo

A, T ou G). A metilação genômica é distribuída em padrão de mosaico, com intercalação de regiões metiladas e não metiladas cobrindo regiões gênicas inteiras (FENG et al., 2010). A presença de ilhas CpG em espécies vegetais tem sido demonstrada (ASHIKAWA, 2001a), mas sua equivalência ou distinção das ilhas CpG observadas em vertebrados não é conhecida atualmente (DEATON; BIRD, 2011; DZIALO et al., 2017).

O controle do status de metilação é realizado por meio de enzimas metiltransferases e de demetilação (SAHU et al., 2013). Três classes de enzimas estão envolvidas no processo de metilação em espécies vegetais: a Metiltransferase 1 (“Methyltransferase 1”, MET1), responsável pela metilação dos sítios CpG; a Cromometilase 3 (“Chromomethylase 3”, CMT3), nos sítios CpNpG; e “Domains Rearranged Methylase” (DRM), que catalisa a metilação “de novo” nos sítios assimétricos CpHpH (SAHU et al., 2013). A metilação nos sítios CpG e CpNpG pode ser mantida após a replicação do DNA por “imprinting” parental pelas enzimas MET1 e CMT3 (CHAN et al., 2005), enquanto a metilação nos sítios assimétricos CpNpN precisa ser estabelecida “de novo” após cada ciclo de replicação do DNA por enzimas DRM em vias dependentes de siRNA (RAMSAHOYE et al., 2000; KARLSSON et al., 2011). A perda de metilação ocorre por mecanismos passivos, que envolvem a inibição da metilação “de novo” ou falha na manutenção do “imprinting” parental (KANKEL et al., 2003), e por mecanismos ativos que podem ocorrer via atividade glicosilase que remove grupos metil das citosinas do DNA (ZHU et al., 2000; AGIUS et al., 2006; MORALES-RUIZ et al., 2006; ZHU et al., 2007), com possível função na prevenção de formação de epialelos hipermetilados estáveis no genoma vegetal (PENTERMAN et al., 2007).

Essas mudanças podem ser mantidas durante a replicação do DNA nas divisões mitóticas e meióticas (CUBAS; VINCENT; COEN, 1999; TAKEDA; PASZKOWSKI, 2006; RICHARDS, 2009; HOLESKI et al., 2012) com efeitos persistentes na expressão gênica em uma próxima geração (RICHARDS, 2011). A influência de variações no padrão de metilação tem sido observada em importantes caracteres agrônômicos como tempo de florescimento e altura da planta (FIELDES, 1994; FIELDES et al., 2005), resistência a patógenos (AKIMOTO et al., 2007;

BOYKO et al., 2007) e produção (TANI et al., 2005). Estudos de polimorfismos no padrão de metilação têm sido realizados para variedades, biótipos ou intraespécies de arroz (*Oriza sativa*) (ASHIKAWA, 2001b), *Arabidopsis* spp. (CERVERA et al., 2002), *Brassica oleraceae* (SALMON et al., 2008) e algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (KEYTE et al., 2006).

A metilação de DNA tem sido um processo epigenético amplamente explorado, em parte devido à facilidade de estudo e à tecnologia disponível (YANG et al., 2011) com vários métodos desenvolvidos que permitem a observação das alterações dos padrões de metilação. As primeiras técnicas se baseavam na separação de citosinas metiladas das não metiladas por técnicas de cromatografia como RP-HPLC (“reversed-phase high performance liquid chromatography”) e TLC (“thin-layer chromatography”), fornecendo informações da proporção entre resíduos de citosina metilados e não metilados, mas incapazes de fornecer informações sobre o status de metilação em nível de genes individuais (HARRISON PARLE-MCDERMOTT, 2011; ALONSO et al., 2016). Nos anos subsequentes, foram empregadas técnicas moleculares que permitem a análise indireta da metilação de DNA em nível genômico ou específico a determinado locus por três abordagens principais: uso de reações químicas que discriminam os resíduos de citosina não metilados dos metilados; purificação por afinidade; e exploração da suscetibilidade diferencial a enzimas de restrição sensíveis à metilação (YAMAMOTO, 2004; LAIRD, 2010).

O método químico mais comum é o da modificação por bissulfito de sódio que causa a conversão de citosinas não metiladas em uracila, enquanto citosinas metiladas permanecem inalteradas no DNA e RNA (PLONGTHONGKUM et al. 2014; SCHAEFER 2015), havendo técnicas que combinam este método com PCR, digestão por enzimas de restrição ou sequenciamento de DNA (HERMAN et al. 1996; XIONG; LAIRD, 1997). Dentre as técnicas de purificação por afinidade têm-se como exemplos o MeDIP-seq (“Methylated DNA immunoprecipitation sequencing”) que consiste no emprego de anticorpos para a precipitação de fragmentos de DNA que contenham citosina metilada e posterior análise por sequenciamento (DOWN et al., 2008) e os métodos relacionados MBD-seq (SERRE et al., 2010) e MethylCap-

seq (BRINKMAN et al., 2010) que empregam proteínas de domínio ligante a methyl CpG para precipitação de fragmentos que contenham metilação no motivo CpG. As enzimas de restrição sensíveis a metilação mais empregadas em estudos de metilação de DNA são *HpaII* (e seu isosquizômero *MspI*) e *SmaI* (com seu neosquizômero *XmaI*) (LAIRD, 2010) sendo usadas em combinação com hibridização ou PCR (BIRD; SOUTHERN, 1978; MCGREW; ROSENTHAL, 1993), a exemplo da abordagem em nível de locus. Em abordagens de ordem genômica têm-se como exemplo métodos como “Restriction Landmark Gel Scanning” (RLGS; HAYASHIZAKI et al., 1994), “Methylation-Sensitive Restriction Fingerprinting” (MSRF; HUANG et al., 1997), “Methylated CpG island Amplification Representational Difference Analysis” (MCA-RDA; TOYOTA et al., 1999), e “Differential Methylation Hybridization” (DMH; HUANG et al., 1999). Mais recentemente, essas três abordagens vêm sendo empregadas em combinação com microarranjos de DNA e plataformas de sequenciamento de nova geração, permitindo a quantificação e localização da metilação na citosina (HARRISON; PARLE-MCDERMOTT, 2011; ALONSO et al., 2016). Estes métodos, porém, requerem sequências de referência de alta qualidade, impossibilitando a aplicação em organismos não modelo (LAIRD, 2010; SCHREY et al., 2013; KIM et al., 2014).

O marcador MSAP proporciona informações como extensão e padrão de metilação na citosina em *loci* distribuídos aleatoriamente no genoma sem requerer o seu conhecimento detalhado, o que permite sua aplicação em organismos não modelo (FRAGA; ESTELLER, 2002; ALONSO et al., 2016). A técnica é uma modificação do AFLP (“amplified fragment length polymorphism”), e consiste no emprego dos isosquizômeros *HpaII* e *MspI* como enzimas de corte frequente, no motivo CCGG (FRAGA; ESTELLER, 2002) com suscetibilidade diferenciada ao status de metilação. A literatura recente apresenta certa inconsistência quanto à sensibilidade desses isosquizômeros à metilação de citosina (SALMON et al., 2008; HERRERA; BAZAGA, 2010; LIRA-MEDEIROS et al., 2010; PAUN et al., 2010; RICHARDS et al., 2012), mas de acordo com especificações recentes da base de dados de enzimas de restrição REBASE (<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>) e com Schultz et al. (2013), a enzima *HpaII* realiza o corte de motivos CCGG sem

metilação em citosina e em motivos com semimetilação, ou seja metilação em uma das fitas de DNA, da citosina externa, enquanto a enzima *MspI* realiza corte do motivo sem metilação em citosina e com semimetilação ou metilação completa da citosina interna. O marcador MSAP tem sido empregado para acessar a variabilidade no padrão de metilação e estrutura epigenética de populações vegetais selvagens e correlaciona-las com condições ecológicas e variações fenotípicas (HERRERA; BAZAGA, 2011; MEDRANO et al., 2014). A técnica também permite a associação entre alterações no padrão de metilação de DNA e função, por meio de clonagem e sequenciamento de fragmentos diferencialmente metilados, extraídos de géis de poliacrilamida, e alinhamentos com bancos de dados pela ferramenta BLAST (GRECO et al., 2012; CICALTELLI et al., 2014). Ainda que a técnica seja amplamente aplicada, diferentes formas de obtenção e interpretação dos dados MSAP estão presentes na literatura (SCHULZ et al., 2013; FULNECEK; KOVARIK, 2014). Contudo, os resultados obtidos de regressão linear e análise de coordenadas principais dos diferentes métodos de análise MSAP avaliados por Schulz et al. (2013) demonstraram uma grande consistência entre eles.

A relação entre patógeno e hospedeiro forma um dos sistemas de maior dinamismo na natureza, apresentando processos epigenéticos que podem ser herdados no decorrer das gerações (POULIN, 2008). Modificações epigenéticas podem fornecer alternativas de variação fenotípica de forma rápida, reversível e prontamente disponível, sendo modeladas pelas pressões de seleção sobre patógeno e hospedeiro (RANDO; VERSTREPEN, 2007; BONDURIANSKY; DAY, 2009). A herança epigenética de resistência a patógenos foi observada em um estudo preliminar realizado por Roberts (1983) onde a inoculação com TMV induziu a resistência na progênie de planta de fumo infectada em comparação às progênies de plantas não infectadas. Outros estudos demonstraram que o ataque de herbívoros e patógenos induziu uma maior concentração de compostos de defesa em sementes em relação às sementes de plantas controle (LAMMERINK; MACGIBBON; WALLACE, 1984; SHATTUCK, 1993). Estudos com TMV em fumo (BOYKO et al., 2007), ferrugem em arroz (AKIMOTO et al., 2007) e em *Brassica oleracea* (SALMON et al., 2008) têm fundamentado a hereditariedade de variações

no padrão de metilação. Em outros estudos com fumo inoculado com o TMV as alterações na metilação de DNA ocorreram de forma rápida (1-24 h) nos genes responsivos NtAlix (WADA et al., 2004) e NtGPDL (CHOI; SANO, 2007), concomitantemente ao estabelecimento de reações de hipersensibilidade. Também foram observadas alterações no nível de expressão gênica do gene NtGPDL consistentes com a hipótese de que as infecções virais alteram os níveis de metilação no genoma e a transcrição gênica da planta. Entretanto, o mesmo não foi observado para o gene NtAlix onde a mudança na metilação não foi simultânea a expressão gênica, uma vez que os transcritos se acumularam 12 h após os primeiros sintomas de hipersensibilidade enquanto a mudança no padrão de metilação ocorreu após 24 h. Isso pode dever-se ao fato que o método de análise de metilação seja menos sensível que a detecção dos transcritos da expressão gênica, ou a expressão do gene NtAlix não estar relacionada diretamente à metilação de DNA (PENG; ZHANG, 2009).

Até recentemente, muito pouco era conhecido acerca da função da metilação de DNA na reprogramação transcricional ocasionada por estresses bióticos. De acordo com as informações na literatura levantadas por Deleris, Halter e Navarro (2016), os fenômenos epigenéticos de metilação e demetilação de DNA impactam a resistência genética a doenças pela regulação de diversos genes relacionados à imunidade vegetal. Essa influência ocorre geralmente em genes de defesa que possuam elementos transponíveis e repetições em suas regiões promotoras, sendo elas, portanto, suscetíveis a alterações no padrão de metilação de DNA. Entretanto, ainda é necessário comprovar experimentalmente se os processos de metilação e demetilação de DNA nos elementos reguladores da região promotora possuem efeitos sobre a acessibilidade aos sítios de ligação para os fatores de transcrição.

Com base na literatura consultada é possível observar a relevância de estudos de transcriptoma e de alterações no padrão de metilação de DNA para caracterizar a resistência da cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) ao SCMV, o único agente causal do mosaico da cana-de-açúcar descrito no Brasil até o momento. A elucidação dessa interação entre patógeno e hospedeiro se encontra em suas etapas iniciais, a exemplo da descrição dos primeiros FDEs em resposta à

infecção pelo SCMV por Medeiros et al. (2014). Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo dar continuidade a identificação de FDEs e avaliar alterações no padrão de metilação de DNA em cana-de-açúcar sob infecção com SCMV.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material vegetal e tratamentos

O estudo foi realizado a partir de amostras foliares coletadas de dois cultivares indexados de cana-de-açúcar de resposta contrastante ao SCMV, IACSP95-5000 (resistente) e IAC91-1099 (suscetível) em experimento conduzido anteriormente por Medeiros et al. (2014). O delineamento experimental foi em fatorial com dois fatores, tratamento e tempo de coleta, em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com condução do experimento em condições de casa de vegetação em vasos plásticos de 1 litro. O fator tratamento consistiu em inoculação falsa (s/i) e inoculação com SCMV Rib-1 (c/i), enquanto o fator de tempo de coleta consistiu na coleta de amostra foliar 24, 48 e 72 h após a inoculação (hai). Para cada combinação entre os níveis dos fatores foram empregadas seis réplicas biológicas, totalizando 36 mudas por cultivar. A inoculação mecânica foi realizada de acordo com o método de Bain (1944) e consistiu no preparo de inóculo viral a partir de folhas jovens de *S. bicolor* (L) 'Rio', previamente inoculado com SCMV Rib-1 e com os sintomas típicos do mosaico. As folhas foram maceradas em tampão fosfato 0,01M, pH= 7,2 e à 4°C, obedecendo a razão mg de folhas : mL de tampão de inoculação de 1:5. Em seguida, foi adicionado pó abrasivo (carbeto de silício, 600 mesh) ao inóculo para a posterior aplicação às folhas recém-expandidas das mudas de cana-de-açúcar usando os dedos e exercendo suave pressão. A presença do SCMV nas mudas inoculadas e ausência nos controles foram confirmadas por RT-PCR ("reverse transcription-polymerase chain reaction"). Com base nesse diagnóstico, foram selecionadas três réplicas biológicas para cada combinação entre

os níveis dos fatores para a aplicação prévia de cDNA-AFLP (MEDEIROS et al., 2014) e a presente aplicação do marcador molecular MSAP.

### 3.2. Obtenção de marcadores MSAP

O DNA genômico total foi extraído de 150 mg de tecido vegetal procedente do bulk das três réplicas biológicas mencionadas acima, segundo o método do CTAB (HOISINGTON; KHAIRALLAH; GONZÁLEZ-DE-LEÓN, 1994) e quantificado com base em um padrão de DNA do fago  $\lambda$ , em gel de agarose 0,8% (p/v) corado com brometo de etídio.

Os marcadores MSAP foram obtidos de acordo com Lei et al. (2006) utilizando o mesmo protocolo dos marcadores do tipo AFLP (VOS et al., 1995), adaptado para cana-de-açúcar no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Cana (IAC). As digestões duplas foram realizadas a partir de 250 ng de DNA genômico, com a enzima de restrição *EcoRI*, em combinação com a enzima *HpaII* ou com *MspI*, usando-se 2,5 U de cada enzima. As reações de restrição foram adicionadas separadamente a um mesmo volume de adaptador/solução de ligação e incubadas em termociclador à temperatura de 37°C, por 15 horas. As reações de ligação foram diluídas 6x em água Mili-Q e uma alíquota de 2  $\mu$ L foi usada como amostra para a pré-amplificação com os oligonucleotídeos *Eco*+0 e *Hpa*+0. As reações foram realizadas com 29 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 56°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos. Uma alíquota de 5  $\mu$ L dessa reação foi diluída 10x em água mili-Q e 2  $\mu$ L dessa diluição foram usados para a amplificação seletiva, que empregou primers *Eco* e *Hpa* com três bases seletivas. As reações de amplificação consistiram em 13 ciclos a 94°C por 30 segundos, 65°C (-0,7 °C/ ciclo) por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, seguidos por 23 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. Os produtos amplificados das combinações seletivas foram separados por eletroforese vertical em gel desnaturante de poliacrilamida a 6% em tampão de corrida TBE (445 mM de Tris-base; 445 mM de ácido bórico; 10 mM de EDTA) pH

8,0. Os produtos das ampliações de duas combinações seletivas *EcoRI*(700)/*MspI* e *EcoRI*(800)/*MspI* foram misturados, acrescidos de tampão de amostra (LiCor, Bioscience), diluídos cinco vezes e desnaturados a 95°C por 5 minutos para separação em gel de poliacrilamida desnaturante a 6,0%, em um genotipador de DNA (Infrared 4300 DNA Analyzer, LiCor Bioscience), utilizando iniciadores seletivos de *EcoRI* marcados com IR700 e IR800 (Figura 2), com análise de 29 combinações seletivas.

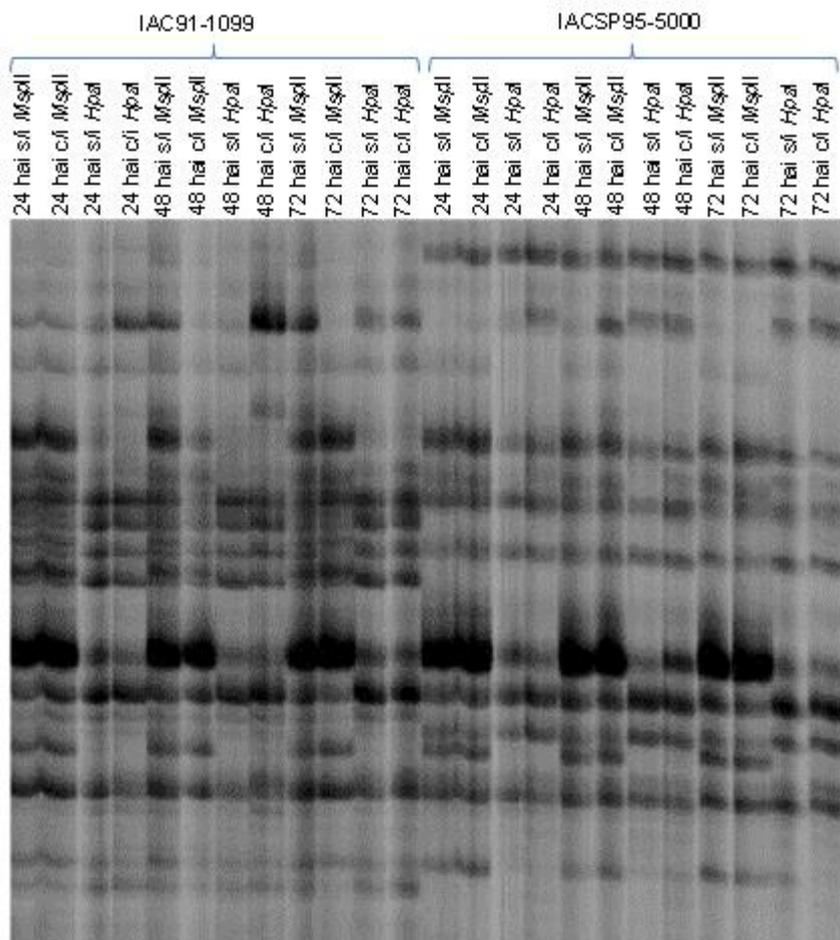


Figura 2: Perfil molecular MSAP da combinação seletiva *EcoRI*aca (IR700) e *HpaI/MspI*acc em gel de poliacrilamida 6%. As vinte e quatro amostras compreendem os dois conjuntos de reação de digestão, dois cultivares, dois tratamentos (inoculação falsa, s/i; inoculação com SCMV, c/i) e três tempos de coleta (24 hai, 48 hai e 72 hai).

### 3.3. Análise dos dados MSAP

Os genótipos em análise foram avaliados em todas as combinações seletivas quanto à presença (+) e ausência (-) de bandas por meio de comparações lado a lado dos perfis moleculares obtidos de cada tratamento (sem inoculação, *s/i*; e com inoculação, *c/i*), de cada cultivar, em cada um dos tempos de coleta, nas digestões realizadas com *EcoRI-HpaI* e *EcoRI-MspII*. Os quatro padrões possíveis, identificados por *+/+*, *+/-*, *-/+*, e *-/-*, representam ausência de metilação, semi-metilação da citosina externa, metilação da citosina interna, metilação completa ou ausência de sítio de restrição, respectivamente. A contagem dos padrões MSAP para os cultivares IAC91-1099 e IACSP95-5000 nas condições *s/i* e *c/i* nos diferentes tempos de coleta foi realizada de acordo com Abid et al. (2017). Desse modo, a proporção de metilação genômica foi subdividida em semi-metilação, considerando a frequência dos loci *+/-*, e metilação completa, considerando a frequência dos loci *-/+* e *-/-*. Os polimorfismos ocasionados pela interação com SCMV foram subdivididos em seis padrões possíveis de presença (+) e ausência (-) de bandas MSAP para o fenômeno de hipometilação e em mais seis para hipermetilação, sendo avaliada a frequência para cada um desses padrões.

Os dados de presença e ausência de bandas MSAP também foram analisados com o pacote R MSAP (PÉREZ-FIGUEROA, 2013) no programa R 3.0.3 (R Core Team, 2014). Foi considerado como grupo cada cultivar sob um dos tratamentos *s/i* e *c/i*, totalizando quatro grupos, sendo eles IAC91-1099 *s/i*, IAC91-1099 *c/i*, IACSP95-5000 *s/i* e IACSP95-5000 *c/i*. Dentro de cada grupo foram incluídos os três tempos de coleta, 24 h, 48 h e 72 h após a inoculação (*hai*). O valor padrão de 0,05 foi adotado como limiar de erro específico de combinação de primers (“threshold”) em todas as combinações seletivas. Os loci com frequências de metilação acima ou abaixo desse limiar foram classificados como loci suscetíveis à metilação (“Methylation Susceptible Loci”, MSL) e não metilados (“Non Methylated loci”, NML), respectivamente. O conteúdo de informação em MSL e NML foi

estimado por meio do índice de diversidade de Shannon, e as diferenças entre esses índices para MSL e NML foram testadas por meio do teste da soma de postos de Wilcoxon (W), ao nível de 5% de significância. Os níveis genômicos de metilação, semimetilação e ausência de metilação foram estimados para cada material com base na frequência dos estados de metilação em MSL. As diferenciações entre modificações epigenéticas (MSL) e genéticas (NML) para os cultivares sob diferentes tratamentos foram estimadas e testadas pela estatística baseada em AMOVA, Phi\_ST, e visualizadas por coordenadas principais (PCoA).

### **3.4. Isolamento dos fragmentos polimórficos MSAP e cDNA-AFLP**

Os fragmentos identificados com polimorfismos provenientes da aplicação da técnica MSAP entre os tratamentos s/i e c/i foram excisados do gel de poliacrilamida e eluídos em 50 µl de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1,0 mM EDTA, pH8,0) a 4°C, incubados a 60°C por duas horas e centrifugados por dez segundos para a separação da poliacrilamida. A reamplificação do fragmento via PCR foi realizada a partir de uma alíquota de 10 µL do eluído, usando os respectivos primers seletivos e as mesmas condições de ciclagem. Os fragmentos diferencialmente expressos (FDEs) provenientes da técnica cDNA-AFLP obtidos previamente por Medeiros et al. (2014) foram reamplificados pelo mesmo método descrito acima. Os produtos foram separados em gel de agarose 1%1X TBE, para a identificação da banda de interesse, novamente eluídos e purificados com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean up system “kit” (Promega, EUA).

### **3.5. Clonagem e sequenciamento**

As informações de seqüência foram obtidas por clonagem dos fragmentos em vetor pGEM-T easy (Promega, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A

reação de ligação consistiu na adição do mix composto por 1  $\mu\text{L}$  de pGEM-T easy, 5  $\mu\text{L}$  de tampão de ligação ("2x Rapid Ligation Buffer, T4 DNA ligase") e 1  $\mu\text{L}$  de enzima T4 DNA ligase a 3  $\mu\text{L}$  da reação de PCR purificada anteriormente, sendo em seguida incubada overnight a 4°C. A transformação foi realizada por meio da adição de 1  $\mu\text{L}$  da reação de ligação em 40  $\mu\text{L}$  de células competentes de *Escherichia coli* DH10B, na transferência para uma cubeta de eletroporação, previamente colocada em gelo, e na imediata eletroporação usando o aparelho GenePulser XCell (BIOHAD). Imediatamente após a transformação, foi adicionado 1 mL de meio LB às células, sendo todo o volume transferido a um tubo eppendorf de 1,5 mL e incubado a 37°C a 200 rpm por uma hora. Após esse tempo, as células *E. coli* foram centrifugadas a 4000 rpm por quatro minutos para a formação de um pellet. Este foi ressuscitado em 80  $\mu\text{L}$  do sobrenadante obtido e transferido para placas de petri contendo meio LB sólido (1,5% de ágar) contendo 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina e previamente tratado com 20  $\mu\text{L}$  de X-gal e 80  $\mu\text{L}$  de IPTG, para a triagem das colônias. Após incubação por 16 horas a 37°C, colônias brancas e individuais, que representam os plasmídeos com o fragmento de interesse interrompendo o gene lacZ, foram selecionadas e transferidas para uma nova placa reserva, também contendo meio LB sólido e ampicilina nas mesmas concentrações, assim como para poços de microplaca para PCR, para a realização da PCR de colônias. Durante a realização da reação de PCR de colônia, as placas reservas foram incubadas a 37°C. Usando-se os oligonucleotídeos iniciadores SP6 e T7 que flanqueiam o fragmento de interesse, a reação de PCR foi conduzida nas condições de ciclagem de desnaturação inicial a 94°C, seguida de 30 ciclos compreendendo desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 3 minutos, e um ciclo final de extensão a 72°C por 7 minutos. Os produtos PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% com brometo de etídeo ( $1 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ) e as colônias contendo o tamanho esperado do produto PCR foram selecionadas da placa reserva. As colônias escolhidas foram transferidas para tubos falcon de 50 mL contendo 15 mL de meio LB com ampicilina nas mesmas concentrações do meio LB sólido e incubadas a 37°C em agitação de 200 rpm por 16 horas. Os plasmídeos foram extraídos com o kit PureYield Plasmid (Promega),

seguindo as especificações do fabricante para posteriormente serem enviados para sequenciamento de clones individuais pelo método de Sanger em reação coposta por 5  $\mu$ L de plasmídeo a 100ng/  $\mu$ L e 2,5  $\mu$ L do “primer” SP6 a 10 $\mu$ M. Com as sequências obtidas, a investigação por similaridade a genes conhecidos e a regiões genômicas foi realizada por meio da ferramenta de alinhamento BLAST em sequências de cana-de-açúcar do banco de dados do CTBE (<http://bce.bioetanol.cnpem.br/ctbeblast/>) e SUCEST (<http://sucest-fun.org/wsapp/>); e com o genoma do sorgo no banco Phytozome (*Sorghum bicolor* v 3.1). Os possíveis domínios proteicos associados a regiões transcritas foram identificados por meio do programa Pfam (<http://pfam.xfam.org/>). As sequências transcritas obtidas pelos fragmentos MSAP e cDNA-AFLP foram alinhadas a sequências genômicas de cana-de-açúcar, dos bancos de dados do CTBE e LBMP, e de sorgo, do banco Phytozome, e investigadas quanto à presença de elementos reguladores, ilhas CpG e repetições em tandem através da base de dados PlantPAN (<http://plantpan2.itps.ncku.edu.tw/promoter.php>) (CHANG et al., 2008). Os fragmentos MSAP que apresentaram alinhamento com região genômica até 3000pb à montante da região 5'UTR de uma região transcrita também foram testados para a presença de elementos reguladores, ilhas CpG e repetições em tandem pelo PlantPAN. A Figura 3 ilustra o processo de clonagem e sequenciamento e as buscas por similaridade e regiões promotoras descritas em 3.4 e 3.5.

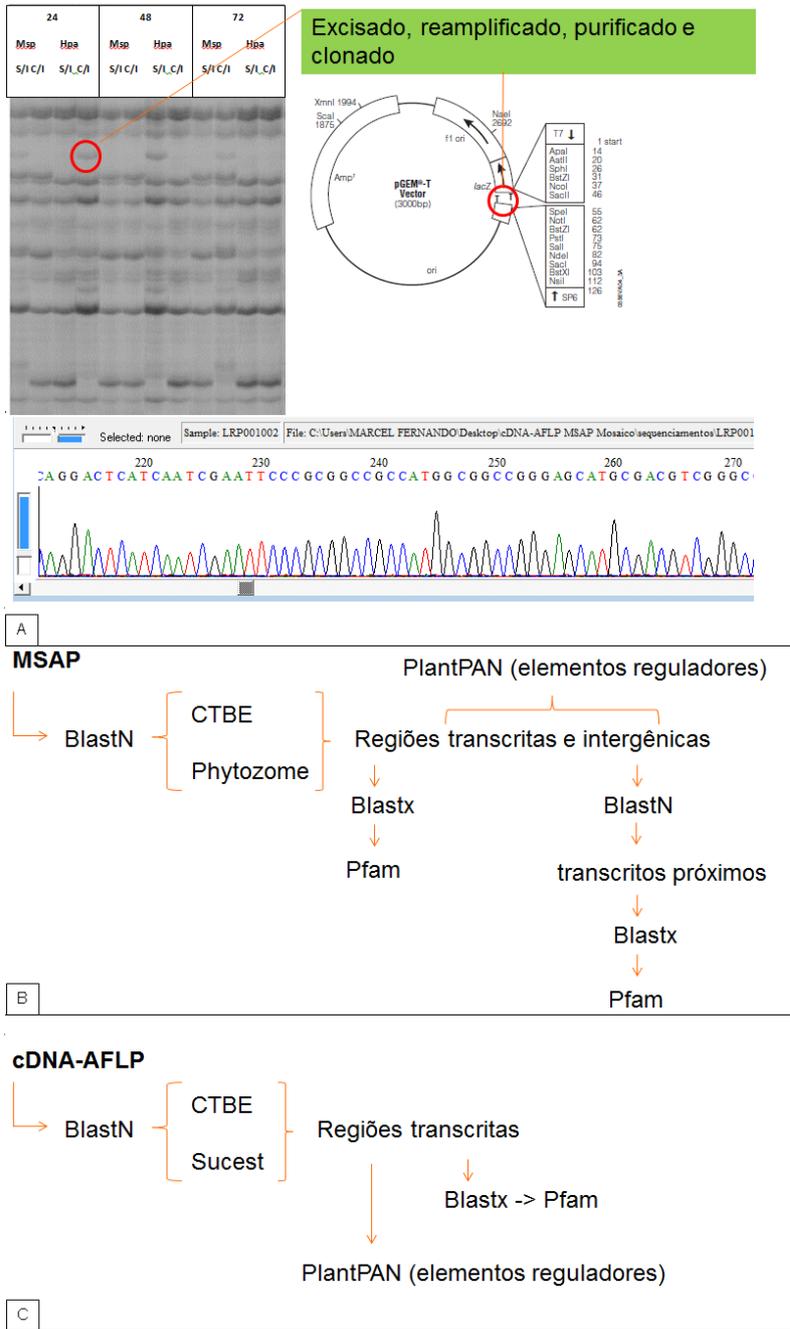


Figura 3. Esquema ilustrativo da clonagem e sequenciamento de fragmentos gerados pelos marcadores MSAP e cDNA-AFLP e a busca por similaridade e função. A: Clonagem e sequenciamento de um fragmento MSAP que apresentou polimorfismo de hipometilação após a inoculação com SCMV, envolvendo as etapas de ligação ao vetor pGEM-T easy e sequenciamento pelo método de Sanger. B: Fluxograma das buscas por similaridade e função dos fragmentos MSAP sequenciados. C: Fluxograma das buscas por similaridade e função dos FDEs cDNA-AFLP sequenciados.

### 3.6. Desenho de oligonucleotídeos iniciadores

A partir dos alinhamentos dos fragmentos resultantes das técnicas MSAP e cDNA-AFLP que apresentaram potencial para elucidar vias de resistência de cana-de-açúcar ao SCMV, foram selecionados genes para validação por PCR em tempo real. Os oligonucleotídeos foram desenhados para os genes alvos por meio da ferramenta PrimerQuest (<https://www.idtdna.com/primerquest/Home/Index>) e analisados pelo software Netprimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>) adotando tamanho de fragmento amplificado (amplicon) de 80 a 150 pares de base (pb) e nota Netprimer acima de 75, a qual se baseia em parâmetros como temperatura de melting (Tm), estabilidade, conteúdo CG e interação entre primers.

Genes de referência observados por Andrade et al. (2017) em cana-de-açúcar em condições de déficit hídrico, já disponíveis no laboratório de Biotecnologia do Centro de Cana – IAC, foram testados em experimentos de validação juntamente com genes de referência mais estáveis em sorgo sob infecção com *Brome mosaic virus* (BMV), do gênero *Bromovirus*, e milho sob infecção com SCMV, observados por Zhang et al. (2013a). No último caso, as sequências dos genes mais estáveis foram obtidas na base de dados DFCI gene index (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>) e ortólogos em cana-de-açúcar foram buscados a partir dessas sequências na base de dados Sucest pela ferramenta BlastN (tabela 1). A partir desses genes ortólogos, oligonucleotídeos foram desenhados pelo mesmo método para os genes alvo descrito acima.

Tabela 1. Relação de sequências ortólogas em cana-de-açúcar para os genes de *Zea mays* e *Sorghum bicolor* do banco de dados DFCI.

Gene	Espécie	Acesso DFCI	Ortólogo Sucest	e-value	Identidade (%)	Gap (%)
EF1 $\alpha$	<i>Z. mays</i>	TC506730	SCVPLB2C05B11.g	0	94	0
UBC18	<i>Z. mays</i>	TC479874	SCEZSD1083D06.g	0	95	0

SAND	<i>S. bicolor</i>	TC131743	SCSGFL4194B02.b	0	93	0
GTPB	<i>S. bicolor</i>	TC111436	SCEZHR1048A04.g	0	93	1
UK	<i>S. bicolor</i>	TC123979	SCQSST1039D09.g	0	96	0

### 3.7. Obtenção de cDNA

A partir do RNA total extraído de folhas recém-expandidas (folhas +1) de cada réplica biológica por Medeiros et al. (2014) foi novamente averiguada a integridade em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), enquanto a quantificação e avaliação de pureza foram realizadas por meio do equipamento NanoDrop ND-2000c (Thermo Scientific), sendo a última obtida através de razões de absorvância 260/280 nm e 260/230 nm.

A partir de  $1 \mu\text{g}$  de RNA, foi realizada a remoção de DNA genômico das amostras por meio de DNase I (Promega, Fitchburg WI, USA) para em seguida ser realizada a transcrição reversa com o kit GoScript Reverse Transcription System (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. Devido a maior ocorrência de FDEs nos tempos de coleta de 24 e 72 h, as reações de validação foram realizadas para estes dois pontos.

### 3.8. Experimentos de validação e análise de dados

As reações foram realizadas com o kit SYBR Green Power Master Mix (Applied Biosystems), de acordo com as especificações do fabricante, no equipamento Applied Biosystems StepOnePlus System (Foster City CA, USA). Para as amplificações foi adotada uma desnaturação inicial a  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  por 2 minutos,  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  por 2 minutos, seguida de 40 ciclos a  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  por 15 segundos e  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  por 1 minuto. A concentração dos oligonucleotídeos testados foi de  $0,2 \mu\text{M}$  em  $10 \mu\text{L}$  de reação de

PCR. Após 40 ciclos, a especificidade dos produtos PCR foi analisada por meio dos perfis das curvas de dissociação (curva de “melting”). A eficiência da RT-qPCR foi observada por meio do programa LinReg PCR, o qual detecta a fase exponencial da amplificação pela plotagem de dados de fluorescência em escala logarítmica (RAMAKERS et al., 2003). Os oligonucleotídeos foram primeiramente testados em sua eficiência e especificidade em bulks de cDNA, cada um consistindo de três réplicas biológicas e dois tempos de coleta, 24 h e 72 h, sendo um bulk para cada cultivar e tratamento, perfazendo um total de quatro bulks: IAC91-1099 (s/i), IAC91-1099 (c/i), IACSP95-5000 (s/i) e IACSP95-5000 (c/i). Os genes candidatos a normalizadores foram testados em sua estabilidade em oito bulks de cDNA, cada um consistindo de três réplicas biológicas: IAC91-1099 24 hai (s/i), IAC91-1099 24 hai (c/i), IAC91-1099 72 hai (s/i), IAC91-1099 72 hai (c/i), IACSP95-5000 24 hai (s/i), IACSP95-5000 24 hai (c/i), IACSP95-5000 72 hai (s/i) e IACSP95-5000 72 hai (c/i). Com os dados de Ct, “Cycle threshold”, e eficiência de reação, a escolha dos genes mais estáveis foi realizada por meio dos algoritmos NormFinder (ANDERSEN; JENSEN; ORNTOFT, 2004) e RefFinder (<http://leonie.esy.es/RefFinder/?type=reference>). As reações de validação foram realizadas para os dois genes normalizadores mais estáveis e para os genes candidatos, com a reação realizada separadamente para as três réplicas biológicas em dois tempos de coleta. Os resultados de Ct foram avaliados segundo a metodologia do  $2^{-\Delta Ct}$  para a obtenção do perfil de expressão de três genes alvo (PFAFFL, 2001). As diferenças foram testadas por testes de randomização dos valores Ct por meio da ferramenta Software de Expressão Relativa (“Relative Expression Software Tool”, REST) (PFAFFL et al., 2002).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Alterações no padrão de metilação**

Um total de 1.131 loci, variando de 11 a 59 por combinação seletiva, foi obtido

com as 29 combinações seletivas avaliadas, considerando as 24 amostras dos cultivares IAC91-1099 e IACSP95-5000. Com os dados da Tabela 2 é possível observar que os níveis de metilação total em condições s/i para o cultivar IAC91-1099 foram de 33,9%, 33,1% e 35,2% para os horários de coleta 24 h, 48 h e 72 h, respectivamente. Já o cultivar IACSP95-5000 apresentou níveis de metilação total em condições s/i de 37,3%, 33% e 35,7% para 24 hai, 48 hai e 72 hai, respectivamente. Na condição c/i, os níveis de metilação total do cultivar IAC911099 foram de 33%, 33,6% e 35,4% para 24 h, 48 h e 72 h, respectivamente, enquanto para o cultivar IACSP95-5000 foram de 34,1%, 34,5% e 32,4%, 24 h, 48 h e 72 h, respectivamente. Os dados sugerem alterações nos níveis de metilação mais expressivas em função do tempo de coleta que os tratamentos s/i e c/i.

Analisando as alterações ocasionadas pela interação com SCMV é possível constatar um comportamento distinto entre os cultivares em estudo. O cultivar IACSP95-5000 apresentou as maiores alterações, que consistiram na diminuição da metilação total em 3,2% 24 hai, aumento de 1,5% 48 hai e novo decréscimo de 3,3% 72 hai. As alterações nos níveis de metilação do cultivar IAC91-1099 ocorreram principalmente 48 hai, com diminuição de 2,2% de metilação completa (a qual inclui loci de metilação da citosina interna) e aumento de 2,7% nos níveis de semi-metilação da citosina externa, resultando no aumento de 0,5% na metilação total. Esses dados sugerem a ocorrência de uma troca entre essas formas de metilação em IAC91-1099 (Tabela 2).

Tabela 2. Frequência dos quatro padrões MSAP possíveis para os cultivares IAC91-1099 e IACSP95-5000 sob os tratamentos s/i e c/i e três tempos de coleta, 24 hai, 48 hai e 72 hai.

Padrão MSAP <i>HpaII/MspI</i>	1099 24 hai		1099 48 hai		1099 72 hai	
	s/i	c/i	s/i	c/i	s/i	c/i
++	748	758	757	751	733	731
+-	72	61	55	86	62	66
-+	207	202	227	197	213	218
--	104	110	92	97	123	116
Total	1131	1131	1131	1131	1131	1131
Metilação completa (%) <sup>a</sup>	27.5	27.6	28.2	26.0	29.7	29.5
Semi-metilação (%) <sup>b</sup>	6.4	5.4	4.9	7.6	5.5	5.8
Total bandas metiladas (%) <sup>c</sup>	33.9	33.0	33.1	33.6	35.2	35.4

Padrão MSAP <i>HpaII/MspI</i>	5000 24 hai		5000 48 hai		5000 72 hai	
	s/i	c/i	s/i	c/i	s/i	c/i
++	709	745	758	741	727	765
+-	49	54	48	65	70	47
-+	220	192	186	189	190	190
--	153	140	139	136	144	129
Total	1131	1131	1131	1131	1131	1131
Metilação completa (%) <sup>a</sup>	33.0	29.4	28.7	28.7	29.5	28.2
Semi-metilação (%) <sup>b</sup>	4.3	4.8	4.2	5.7	6.2	4.2
Total bandas metiladas (%) <sup>c</sup>	37.3	34.1	33.0	34.5	35.7	32.4

a: {[Metilação da citosina interna (-+) + Metilação das duas citosinas ou ausência de sítio(--)]/Número total de loci}\*100; b: {[Semimetilação da citosina externa (+-)]/Número total de loci}\*100; c: Metilação completa (a) + Semi-metilação (b).

Na Tabela 3 seguem os loci MSAP subdivididos em loci não responsivos a SCMV e tempo de coleta, loci responsivos apenas a tempo de coleta, loci responsivos a SCMV (hipometilação, hipermetilação e troca da citosina metilada) e os loci não variáveis dentre os responsivos a SCMV em, pelo menos, um dos tempos de coleta, em um total de 24 categorias de presença e ausência de bandas. Os resultados indicam o comportamento diferenciado nos fenômenos de hipometilação e hipermetilação para os cultivares em estudo. A hipometilação total em IAC91-1099 apresentou uma tendência de aumento entre os horários de coleta 24 h e 48 h, principalmente devido ao polimorfismo -+/++, e entre 48 h e 72 h, devido principalmente a -/-+. O cultivar IACSP95-5000 apresentou aumentos de hipometilação 24 hai, devido aos polimorfismos -+/++ e -/-+, e 72 hai devido ao polimorfismo +/-+. A hipermetilação no cultivar IAC91-1099 aumentou de 24 hai para 48 hai, resultado da diminuição dos polimorfismos ++/+- e +/--, e aumento dos polimorfismos ++/+ e -/--, e um pequeno aumento de 48 hai para 72 hai, resultante da diminuição do polimorfismo ++/+ e aumentos de +/--, -/+ e +/-+. O cultivar IACSP95-5000 apresentou aumento da hipermetilação de 24 hai para 48 hai e diminuição 48 hai para 72 hai devido a alterações na frequência de ++/+-, revelando alterações distintas a IAC91-1099. Os polimorfismos de troca da citosina metilada, representados por -+/+- e +/-+, no cultivar IAC91-1099 48 hai não explicam a troca da forma de metilação observada na Tabela 2. De acordo com a Tabela 3, isso se deveu à hipometilação de padrão -+/++, que contribuiu para a diminuição da

metilação da citosina interna, e à hipermetilação de padrão ++/+-, que contribuiu para o aumento da metilação da citosina externa.

Tabela 3. Frequência dos padrões MSAP e polimorfismos possíveis para os cultivares IAC91-1099 e IACSP95-5000 sob os tratamentos S/i e C/i e três tempos de coleta.

Resposta	(S/I) <sup>a</sup>		(C/I) <sup>a</sup>		Cultivares					
	Hpall	Mspl	Hpall	Mspl	IAC91-1099			IACSP95-5000		
Sem alterações <sup>c</sup>	+	+	+	+	665			662		
	+	-	+	-	24			12		
	-	+	-	+	139			131		
	-	-	-	-	59			98		
Subtotal					887			903		
					Horários de coleta					
					24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Alteração com tempo de coleta <sup>c</sup>	+	+	+	+	11	9	9	4	12	10
	+	-	+	-	7	7	2	7	5	6
	-	+	-	+	6	10	11	11	10	9
	-	-	-	-	5	3	7	11	6	8
Subtotal					29	29	29	33	33	33
Alteração com SCMV <sup>d</sup>										
Hipometilação	+	-	+	+	6	4	12	11	10	32
	-	+	+	+	20	34	10	42	7	17
	-	-	+	+	2	0	1	1	0	8
	-	-	+	-	10	6	14	20	9	5
	-	-	-	+	6	9	21	5	5	15
Troca	-	+	+	-	1	2	11	3	4	3
Subtotal					45	55	69	82	35	80
Hipermetilação	+	+	+	-	4	34	9	4	23	7
	+	+	-	+	13	6	13	13	11	11
	+	+	-	-	1	4	3	1	0	1
	+	-	-	-	19	5	6	9	5	3
	-	+	-	-	4	11	20	3	6	9
Troca	+	-	-	+	1	2	12	2	4	3
Subtotal					42	62	63	32	49	34
Sem alterações <sup>e</sup>	+	+	+	+	54	39	34	25	50	36
	+	-	+	-	15	13	6	8	12	14
	-	+	-	+	37	31	22	30	28	21
	-	-	-	-	22	15	21	18	21	10
Subtotal					128	98	83	81	111	81
Total					1131	1131	1131	1131	1131	1131

a: Inoculação falsa (S/I), Inoculação com SCMV (C/I); b: loci não responsivos a tempo de coleta e SCMV; c: loci responsivos apenas ao tempo de coleta; d: loci responsivos a SCMV por meio de fenômenos de Hipermetilação, Hipometilação e troca da citosina metilada; e: ausência de polimorfismo dentre os loci responsivos a SCMV em, pelo menos, um tempo de coleta.

A análise global do experimento pelo pacote R MSAP revelou um número total de MSL de 457 e de 674 NML, sugerindo uma porcentagem de metilação genômica em cana-de-açúcar de 40% ao considerar os dois cultivares nas diferentes

condições s/i e c/i e horários de coleta. A proporção de loci polimórficos foi de 59% para MSL (272 loci) e de 13% para NML (90 loci), refletindo as diferenças entre e dentro dos grupos usados na análise. Os índices de diversidade de Shannon foram de  $I = 0,58 \pm 0,12$  para MSL e  $I = 0,67 \pm 0,088$  para NML, sendo esta diferença significativa ( $W= 3756$ ;  $P < 0,0001$ ), revelando uma maior diversidade genética quando comparada à epigenética. A análise de variância molecular (AMOVA), revelou diferenças globais significativas para MSL ( $\Phi_{ST} = 0,32$  ;  $P= 0,008$ ) e NML ( $\Phi_{ST} = 0,96$  ;  $P= 0,0067$  ) (Tabela 4). A análise AMOVA permite observar uma maior variância em MSL para os tempos de coleta em relação aos cultivares sob os diferentes tratamentos, enquanto a principal fonte variação para NML foram os grupos.

Tabela 4. Análise AMOVA para loci suscetíveis a metilação (MSL) e loci não metilados (NML) entre grupos (cultivar) e dentro de grupos (tempo de coleta após inoculação)

Fontes de variação	GL	SQ	QM	Variância
<b>MSL</b>				
Entre grupos	3	326,8	108,9	22,35
Dentro de grupos	8	335,1	41,88	41,88
Total	11	661,9	60,17	
<b>NML</b>				
Entre grupos	3	250,3	83,44	27,45
Dentro de grupos	8	8,667	1,083	1,083
Total	11	259	23,55	

De acordo com a análise PCoA, cada cultivar formou um grupo distinto tanto em MSL como NML, havendo sobreposição entre os grupos s/i e c/i para ambos os cultivares. A variação dentro de grupo foi maior para MSL para ambos os cultivares, indicando diversidade ao longo dos três tempos de coleta. Também é possível observar uma maior diversidade dentro de grupo para NML no cultivar IACSP911099 em relação ao IACSP95-5000. As coordenadas principais em MSL explicaram 50,3% da variação total, enquanto em NML foi de 97,4%, demonstrando a capacidade destes fatores em determinar a formação de grupos (Figura 4).

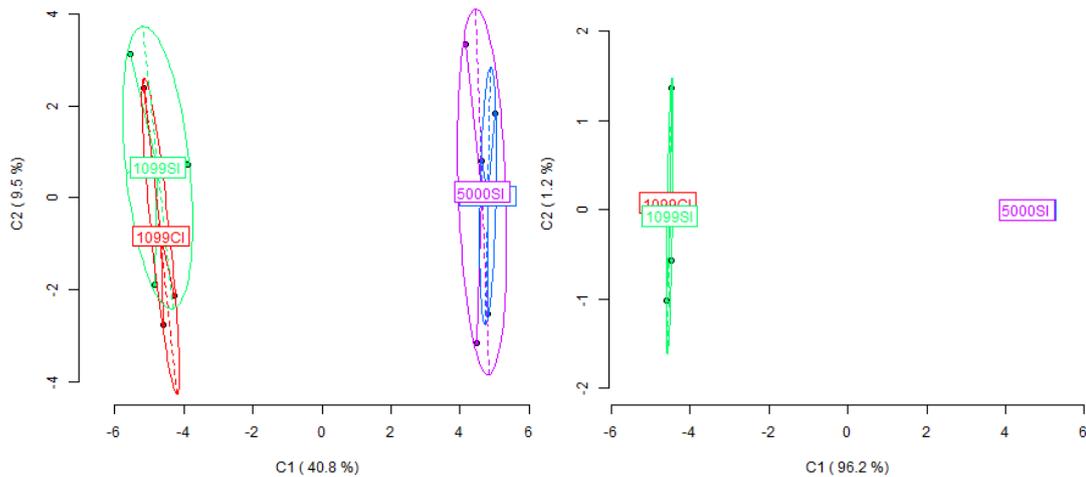


Figura 4. Representação da análise por coordenadas principais (PCoA) para variações origem epigenéticas (MSL) e genéticas (NML) entre cultivares sem inoculação e com inoculação.

#### 4.2. Sequenciamento e análise dos fragmentos MSAP polimórficos

Um total de 19 fragmentos polimórficos em resposta ao SCMV foi clonado e sequenciado. As sequências apresentaram um tamanho médio de 122 pares de base (pb), variando de 45 a 238 pb. Os resultados BLAST revelaram 16 fragmentos com alinhamentos significativos em pelo menos um dos bancos de dados (e-value inferior a  $1e^{-5}$ ). Dentre esses fragmentos, oito se alinharam a transcritos revelando hits correspondentes a respostas a estresses bióticos e abióticos, fragmento 5000\_05; síntese de compostos secundários, 5000\_10; síntese de moléculas de defesa, 5000\_14; elementos transponíveis, 5000\_16 e 5000\_18; transporte de peptídeos, 5000\_13; remodelação da cromatina, 1099\_03; e um transcrito sem domínio pfam, 1099\_12 (tabela 5).

Tabela 5. Relação de fragmentos MSAP e resultado de alinhamento por BLASTN nos bancos de dados do CTBE e Phytozome.

ID.fragmento (tempo de coleta)	Eco/Mspl	Tamanho (pb)	BLASTN CTBE	e-value	Pfam	Phytozome	e-value	Pfam
Hipometilação (c/i)								
1099_01 (24 h)	ACA/TTG	80	SCSP803280_000 073600	4e-38		Chr02	3,8e-11	
1099_02 (24 h)	ACA/TTG	82	SCSP803280_000 073600	3e-32		Chr02	5,4e-9	
1099_03 (24 h)	ACA/TTG	45	SP803280_c10902 3_g1_i1	7e-20	RRM	Sobic.004G158400 .1 (primary)	3,8e-12	RRM
1099_04 (24 h)	ACA/TTG	117	SCSP803280_000 016069	8e-49		Sem similaridade		
5000_05 (24 h)	ACA/TA G	86	SP803280_c63990 _g1_i1	2e-21	Myb_DN Abinding	>Sobic.003G08010 0.2	5,7e-3	Pkinase
5000_06 (24 h)	ACA/TA G	114	SCSP803280_000 117135	1e-54		Sobic.003G042200 .2 (primary)	2,9e-2	LRR
5000_07 (24 h)	ACA/TTG	101	Sem similaridade			Sem similaridade		
5000_08 (48 h)	ACA/AC A	119	Sem similaridade			Sem similaridade		
5000_09 (48 h)	ACA/AC C	125	SCSP803280_000 060689	7e-62		Sem similaridade		
5000_10 (72 h)	ACA/AC A	183	SCSP803280_000 070867	5e-94		Sobic.004G288500 .1 (primary)	1e-23	P450
Hipermetilação (s/i)								
1099_11 (48 h)	ACA/AC C	222	SCSP803280_000 032883	3e-115		Chr09	4,4e-4	

1099_12 (48 h)	ACA/TAG	160	SCSP803280_000009828	4e-38		Sobic.006G031000.1 (primary)	2,3e-37	Sem pfam
5000_13 (24 h)	ACA/ACA	144	SP803280_c82090_g1_i1	2e-67	PTR2	Sobic.010G109200.1	8,1e-49	PTR2
5000_14 (24 h)	ACA/TAG	154	SP803280_c104096_g2_i1	2e-68	TAXI_N, TAXI_C	Sobic.010G014500.1 (primary)	1,1e-15	TAXI_N, TAXI_C
5000_15 (24 h)	ACA/TAG	104	Sem similaridade			Sem similaridade		
5000_16 (48 h)	ACA/TAG	238	SP803280_c132337_g1_i1	2e-39	zf-RVT	Chr02	8,6e-15	Transposon protein
5000_17 (72 h)	ACA/TTG	82	SCSP803280_000073600	7e-38		Chr02	7,4e-14	
5000_18 (72 h)	ACA/ACC	126	SP803280_c89867_g1_i4	1e-47	NB-ARC/Retrotransgag	Chr06	1,9e-43	
5000_19 (72 h)	ACA/TTG	117	SCSP803280_000016069	7e-56		Sem similaridade		

---

A análise de regiões promotoras nos alinhamentos MSAP com regiões transcritas revelaram os motivos reguladores à montante do início da região 5'UTR para os fragmentos 1099\_03, 5000\_05, 5000\_10, 5000\_13, 5000\_14, 5000\_16 e 5000\_18, que consistiram em GATA, NAC; NAM, Homeodomain, bHLH, bZIP e CG-1. A presença de ilhas CpG à montante do início da região 5'UTR foi observada para os fragmentos supracitados, com exceção para 5000\_05 (Tabela 6).

Dos oito fragmentos que se alinharam com regiões não transcritas dos clusters de cana-de-açúcar, sete se encontraram a menos de 3000pb à montante da região 5'UTR de uma região transcrita dos bancos de dados do CTBE ou SUCEST. Motivos reguladores em potencial dentro do fragmento MSAP foram observados e consistiram em bHLH, AT-Hook, bZIP, Myb/SANT e Homeodomain; HD-ZIP. Ilhas CpG abrangeram os alinhamentos MSAP 1099\_04, 5000\_06, 5000\_09, 5000\_17 e 5000\_19 (Tabela 7).

Tabela 6. Análise de regiões promotoras e elementos reguladores putativos de alinhamentos MSAP com transcritos pelo PlantPAN.

ID. fragmento	Posição MSAP	Pfam	Nome sítio	Sequência	Posição (fita)	Ilha CpG	Repetição Tandem
1099_03	-176/-60	RRM	GATA	cCGATCtgg	-8(+)	-279/+398	
			NAC; NAM	ttGCGTGgca	-103 (+)		
5000_05	+200/+285	Myb_DNAbinding	Homeodomain	ctTAATCtaa	-11 (+)		
5000_10	+3176/+3318	P450	bHLH	gcgCGCGC	-3 (-/+)	-564/+2689	
			bZIP	acgTGTGT	-21 (-)		
5000_13	+145/+288	PTR2	CG-1	ACGCGccca	-13 (-)	-1843/+1222	
5000_14	+1471/+1625	TAXI_N; TAXI_C	bZIP	ACAGGggt	-5 (+)	-328/+1834	
5000_16	-94/+116	zf-RVT	bZIP	ggCGTCAt	-11 (+)	-618/+269	
			Homeodomain	aggCGTCAtc	-12 (-)		
5000_18	-176/-60	NB- ARC/Retrotransgag	NAC;NAM	ctaGCGTAaa	-3 (+)	-1563/-361	
			bHLH	taaACGTGg	-9 (+)		+32/+754
			bZIP	taaACGTGgt	-9 (+)		

Posição em relação ao início da região 5'UTR, sendo os valores negativos referentes a posições à montante, e os positivos à jusante deste ponto de referência.

Tabela 7. Análise de regiões promotoras e elementos reguladores putativos de alinhamentos MSAP intergênicos pelo PlantPAN.

ID. fragmento	Transcrito (posição MSAP) <sup>a</sup>	Pfam	Nome sítio	Sequência	Posição <sup>a</sup>	Ilha CpG <sup>a</sup>	Repetição Tandem <sup>a</sup>
1099_01	SCMCST1049F01.g <sup>b</sup>	Pkinase_Tyr	bHLH	GCATGtga	-430 (+)	-3126/-1046	
1099_02	(-507/-425)		AT-Hook	TTTTTtctg	-443 (-)		
1099_04	SP803280_c78142_g1_i2 <sup>c</sup> (-1895/-1778)	RVT_1	bZIP	attCGTGT	-1807 (-)	-2052/-1498 +35/+4457	
5000_06	SCCCLR1C04G04.g <sup>b</sup> (-332/-218)	Sem pfam	Myb/SANT	aaCCCTAgcc	-280 (-)	-1655/+11	
5000_09	SCQGRT1040A08.g <sup>b</sup> (-1778/-1655)	RVT; PTR2; PTR2	bZIP;Homeodomain;HD-ZIP	atttctgATGATcactccc	-1650 (+)	-1964/-922	+44/+84
5000_17	SCMCST1049F01.g <sup>b</sup> (-509/-427)	Pkinase_Tyr	bHLH	GCATGtga	-432 (-)	-3143/-373	
			AT-Hook	TTTTTtctg	-445 (-)		
5000_19	SP803280_c78142_g1_i2 <sup>c</sup> (-1895/-1778)	RVT_1	bZIP	attCGTGT	-1807 (-)	-2052/-1498	

---

+35/+4457

a: Posição em relação ao início da região 5'UTR, sendo os valores negativos referentes a posições à montante, e os positivos à jusante deste ponto de referência, b: Transcrito do banco de dados SUCEST; c: Transcrito do banco de dados do CTBE

### 4.3. Sequenciamento e análise dos FDEs

Os 15 fragmentos cDNA-AFLP clonados e sequenciados apresentaram um tamanho médio de 71 pb, variando de 27 a 211 pb. Os resultados BLAST revelaram alinhamentos significativos com sequências de cana-de-açúcar e sorgo, mesmo para os menores fragmentos (Tabela 8). Os hits corresponderam a transcritos com motivos de proteína gag de retrotransposon (5000\_20); repetições kelch (5000\_21); proteína do fotossistema II (5000\_22); chaperonas (5000\_23, 5000\_24 e 5000\_25); oxidoredutase glucose-frutose (5000\_26); proteínas transportadoras de metais pesados (5000\_28, 1099\_32 e 1099\_33); domínio protéico “zinc finger” envolvido em processo de metilação de cromatina e proteína ligante sítio simétrico CpG metilado (5000\_29); fosfoenolpiruvato carboxilase (5000\_31 e 5000\_35); e proteína ligante a lipídeos (5000\_34). A sequência 5000\_27 se alinhou com uma região não transcrita de cana-de-açúcar, enquanto a sequência 5000\_30 se alinhou com um transcrito de difícil identificação. A região promotora apresentou os elementos reguladores putativos Homeodomain, Myb/SANT, Dof, Ap2, bZIP, WRKY, At-Hook e ERF. Ilhas CpG abrangeram o início da região 5'UTR nos fragmentos 5000\_24, 5000\_25, 5000\_28, 5000\_29, 1099\_32, 1099\_33 e 5000\_34 (Tabela 9).

Tabela 8. Relação dos fragmentos cDNA-AFLP e resultado de alinhamento por BLASTN nos bancos de dados do SUCEST, CTBE e Phytozome.

ID.fragmento (tempo de coleta)	Combinação Seletiva	Tamanho (pb)	Transcrito <sup>a,b</sup>	e-value	Pfam	Phytozome	e-value	Pfam
Regulados positivamente (c/i)								
5000_20 (24 h)	EcoRI AAC/M selCGT	63	SP803280_c77422_g1_i1 <sup>a</sup>	6e-30	Retrotrans_gag	Sem similaridade		
5000_21 (24 h)	EcoRI ACG/M splTTG	36	SCRFAM1027D10.g <sup>b</sup>	2e-10	Kelch_1	Sobic.001G488500.4	1.4e-8	Kelch_1
5000_22 (24 h)	EcoRI ACG/M splACT	29	SP803280_c105730_g3_i4 <sup>a</sup>	1e-11	PSII	Sobic.003G168800.1	3.3e-6	PsbH
5000_23 (24 h)	EcoRI AAA/M selCTT	52	SP803280_c109710_g1_i1 <sup>a</sup>	7e-14	Clp_N; AAA; UVR; AAA_2; ClpB_D2-small	Sobic.008G081900.1	1.1e-7	Clp_N; AAA; UVR; AAA_2; ClpB_D2-small
5000_24 (72 h)	EcoRI AAA/M selCTT	111	SCJLLB2076G05.b <sup>b</sup>	9e-53	Clp_N; AAA; UVR; AAA_2; ClpB_D2-small	Sobic.008G081900.1	3.7e-45	Clp_N; AAA; UVR; AAA_2; ClpB_D2-small
5000_25 (24 h)	EcoRI AAA/M selCTT	51	SCSGAD1005A09.b <sup>b</sup>	7e-10	Clp_N; AAA; UVR; AAA_2; ClpB_D2-small	Sobic.008G081900.1	1.1e-7	Clp_N; AAA; UVR; AAA_2; ClpB_D2-small
5000_26 (24 h)	EcoRI ACG/M	139	SCVPLB2088B04.g <sup>b</sup>	6e-31	GFO_IDH_MocA	Sobic.007G037900.1	1e-53	GFO_IDH_MocA

<i>spl</i> ACT									
5000_27 (24 h)	EcoRIACG/ <i>M spl</i> ACT	105	SCSP803280_00004 0222 <sup>a</sup>	8e-33			Sem similaridade		
5000_28 (48 h)	EcoRIAGC/ <i>M spl</i> ACA	51	SCSBFL1041H02.g <sup>b</sup>	3e-19	HMA	asmb1_270.sorghumv 31_pasa2	1.5e-18	Sem pfam	
5000_29 (48 h)	EcoRIACC/ <i>M sel</i> CTT	138	SCACLR1132A12.g <sup>b</sup>	1e-70	zf-CW; MBD	Sobic.009G132800.3	1e-53	zf-CW; MBD	
5000_30 (72 h)	EcoRIACA/ <i>M sel</i> CTT	211	SP803280_c102182 _g1_i2 <sup>a</sup>	2e-105		Sobic.002G370900.1	6.2e-78	Peptidase_S 9	
5000_31 (72 h)	EcoRIACG/ <i>M spl</i> ACT	27	SCRULR1020D09.g <sup>b</sup>	6e-6	PEPcase	Sobic.010G160700.1	8.4e-5	PEPcase	
1099_32 (24 h)	EcoRIAGC/ <i>M spl</i> ACA	51	SCSBFL1041H02.g <sup>b</sup>	2e-18	HMA	asmb1_270.sorghumv 31_pasa2	1.5e-18	Sem pfam	
1099_33 (48 h)	EcoRIAGC/ <i>M spl</i> ACA	51	SCSBFL1041H02.g <sup>b</sup>	2e-19	HMA	asmb1_270.sorghumv 31_pasa2	1.8e-17	Sem pfam	
Regulados negativamente (s/i)									
5000_34 (24 h)	EcoRIAAA/ <i>M sel</i> CTT	39	SCSBFL1044D12.g <sup>b</sup>	6e-13	SMP_LBD ; C2; C2	Sobic.002G279500.1	4.7e-9	SMP_LBD; C2; C2	
5000_35 (24 h)	EcoRIACG/ <i>M spl</i> ACT	27	SCRULR1020D09.g <sup>b</sup>	6e-6	PEPcase	Sobic.010G160700.1	8.4e-5	PEPcase	

Transcrito Sucest<sup>a</sup>, Transcrito CTBE<sup>b</sup>.

Tabela 9. Análise de regiões promotoras e elementos reguladores putativos dos alinhamentos FDEs pelo PlantPAN.

ID. fragmento						
Regulado positivamente	Pfam	Nome sítio	Sequência	Posição (fita) <sup>a</sup>	Ilha CpG <sup>a</sup>	Repetição Tandem <sup>a</sup>
5000_20 (24 h)	Retrotrans_gag	Homeodomain	gcTAATCgtg	-14 (+)	+846/+282	-364/-391
		Myb/SANT	cggcATCTTg	-177 (+)	-1127/+45	
5000_21 (24 h)	Kelch_1	Dof	AAAGC	-34 (+)	-1596/+777	
5000_22 (24 h)	PSII	S/A				
5000_23 (24 h)	Clp_N	Dof	ttaAAAAGgga	-27 (+)	+462/+1333	
5000_24 (72 h)	ClpB D2-small	Ap2	acgGCGGCcg	-256 (+)	-316/+555	
		bZIP	tgtCAGCTgg	-277 (+)		
5000_25 (24 h)	Clp_N	bZIP	gctgCTGTcc	-35 (-)	-296/+554	
		WRKY	agaGTCAAgtt	-53 (+)		
5000_26 (24 h)	GFO_IDH_MocA	Homeodomain	acAATAAtg	-5 (-)		
		AT-Hook	taacAATAAt	-7 (+)		
5000_27 (24 h)						

5000_28 (48 h)	HMA	bZIP	agaTGTGT	+2 (-)	-1303/+219	+182/+253
		AT-Hook	TTTTTctc	- 34 (-)		
5000_29 (48 h)	zf-CW; MBD	Ap2; ERF	cGCCGGca	-5 (+/-)	-348/+445	
5000_30 (72 h)						
5000_31 (72 h)	PEPcase	Homeodomain	gattaTTATTgc	-10 (-)	-2265/+199	
		AT-Hook	aTTATTattg	-11 (-)		
1099_32 (24 h)	HMA	bZIP	agaTGTGT	+2 (-)	-1303/+219	+182/+253
		AT-Hook	TTTTTctc	- 34 (-)		
1099_33 (48 h)	HMA	bZIP	agaTGTGT	+2 (-)	-1303/+219	+182/+253
		AT-Hook	TTTTTctc	- 34 (-)		
Regulado negativamente						
5000_34 (24 h)	SMP_LBD; C2; C2	Homeodomain	gacATTAAct	-16 (-)		
5000_35 (24 h)	PEPcase	Homeodomain	gattaTTATTgc	-10 (-)	-2265/+199	
		AT-Hook	aTTATTattg	-11 (-)		

a: Posição em relação ao início da região 5'UTR, sendo os valores negativos referentes a posições à montante, e os positivos à jusante deste ponto de referência.

#### 4.4. Genes de referência

Os oligonucleotídeos desenhados a partir de genes ortólogos aos observados por Zhang et al. (2013a) (Tabela 1) foram avaliados em sua eficiência e especificidade. Os oligonucleotídeos desenhados para os genes UK, SAND e UBC18 apresentaram um único pico de fluorescência na curva de melting, sugerindo a amplificação de um único fragmento (Tabela 10). Esses resultados foram confirmados em corrida de gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídeo ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), com tamanho de fragmento próximo ao amplicon predito. A partir do experimento de validação realizado com mais cinco oligonucleotídeos desenvolvidos por Andrade et al. (2017), sendo eles GAPDH, RPL1, TUB, ACT e UBQ1, foram obtidos dados de eficiência e Ct, os quais foram utilizados para a identificação dos genes mais estáveis e do melhor par de normalizadores pelo algoritmo NormFinder. De acordo com o NormFinder, o gene mais estável foi o SAND, seguido por GAPDH, sendo a melhor combinação de pares de normalizadores o SAND e o GAPDH. Com os dados Ct também foi possível comparar os genes candidatos a normalizadores pelo software RefFinder, mostrando o SAND seguido pelo GAPDH como os mais estáveis para os algoritmos DeltaCt e BestKeeper, enquanto no algoritmo NormFinder do RefFinder, o GAPDH foi mais estável que o SAND, e pelo algoritmo Genorm os genes mais estáveis foram o UBC18 e UK. No ranking compreensivo do RefFinder, o gene mais estável é o SAND seguido por GAPDH (dados não mostrados), assim como o observado pelo NormFinder, sendo estes os genes escolhidos para a validação dos genes possivelmente envolvidos na resistência ao SCMV (Tabela 11).

Tabela 10. Relação dos oligonucleotídeos desenhados a partir de ortólogos em cana-de-açúcar de genes estáveis na condição de infecção viral em *S. bicolor* e *Z. mays*.

Primers	Sequência (5'-3')	Nota Netprimer	Amplicon (pb)	Amplicon Tm (°C)	Ct Médio	Eficiência (LinReg) (%)	R <sup>2</sup>
GTPB	F: GACGATGATGATCTGATCCAGTAG	91	126	62	-	0	-
	R: TGATCCCAGCCAATGTA ACTC	91					
UK	F: GCAATCTAAGGGACATAATAAAGGTG	100	140	72,8	21,8	90	0,990
	R: AATCGAATTGCCTACTGATATGTTG	87					
SAND	F: CTGTGTGTAAGTTGATATGTCTATGTTG	92	94	71,8	23,3	90	0,998
	R: CAACAACGATGGTACTGCCT	93					
E1F1	F: CTGGACCAGATCACCGA	88	93	78,1	31	90	0,999
	R: GACAGTTCCAATACCACCAATTTA	88					
UBC18	F: GCCTGTCAGCCTTCCTTAC	100	100	74	23	90,9	0,999
	R: GGTAAGCTTCGCAAATCCAATAG	81					



#### 4.5. Genes candidatos

Dentre os sete pares de oligonucleotídeos desenhados para os genes encontrados pelos alinhamentos com fragmentos cDNA-AFLP e MSAP, os genes FDE\_1, FDE\_2 e FDE\_4 apresentaram produto específico na curva de melting e eficiência de 90% para as amostras de cDNA testadas (Tabela 12). O perfil de expressão (Figura 5) e a análise estatística REST (Tabela 13) revelam uma complexidade na expressão dos FDEs validados por qRT-PCR. Na comparação entre os tratamentos *s/i* e *c/i*, a expressão conjunta das três réplicas biológicas indica a regulação negativa dos FDEs 2 e 4 para IAC91-1099 72 hai a 5% de probabilidade, e do FDE\_4 para IACSP95-5000 72 hai, também a 5% de probabilidade (Tabela 13). Os cultivares em estudo se diferenciaram quanto à abundância relativa de transcritos nos três FDEs avaliados, considerando a expressão conjunta das três réplicas biológicas. Maiores abundâncias de transcritos foram observadas no cultivar IACSP95-5000 para o FDE\_2 72 hai em ambos os tratamentos, *s/i* e *c/i*, e para o FDE\_4 24 hai, sob o tratamento *c/i*, e 72 hai nos tratamentos *s/i* e *c/i*. Por sua vez, a abundância de FDE\_1 foi menor em IACSP95-5000 24 hai no tratamento *s/i*.

Tabela 12. Relação dos oligonucleotídeos desenhados a partir de genes encontrados por alinhamentos com fragmentos cDNA-AFLP e MSAP.

Primers	Descrição	ID Fragmento	Expressão predita (tempo de coleta) <sup>a</sup>	Sequência (5'-3')	Nota Netprimer	Amplicon (pb)	Amplicon (Tm) (°C)	Ct	Eficiência (LinReg) (%)
FDE_1	zf-CW; MBD	5000_29	Regulação positiva 48 hai	F: GAAGCAGGAGAAGGCAGAG	100	100	75,8	24	90
				R: GATAGGATGGGACATGATCTTGAG	90				
FDE_2	Clp_N	5000_24	Regulação positiva 72 hai	F: CTCGTACATAACAGATGATGACAAA	93	123	71,2	18,5	90
				R: AAAGGCAGCAACGATTTCC	90				
FDE_3	bZIP_1	Medeiros et al. (2014)	Regulação positiva 72 hai em IACSP95-5000	F: CTGTCCTGTCTACTGTATGTTT	100	91	74,8	28,9	90,8
				R: TCAAGTCCGTTTCAGTTCACC	100				
FDE_4	VQ	Medeiros et al. (2014)	Regulação positiva 72 hai em IACSP95-5000	F: CAACACTGGTACAAGAGACTAGAA	90	83	73,7	25	91,4
				R: TGTCACCTTCATGGTCATAGC	90				
MET_5	Retrotransg ag; NB_ARC	5000_18	Hipermetilação 48 hai	F: CTCTCTGTTGATTCTATTGTTTGT	100	97	64,5	-	21,1
				R: GGTGAAGTGCTCACCGATA	80				
MET_6	RVT_3	5000_16	Hipermetilação 48 hai	F: CACTTTGAGTGTTTACATGTTTCT	85	99	62	-	0
				R: CCCAAATAACCCACGAATTCAC	82				
MET_7	RRM1	1099_03	Hipometilação 24 hai	F: TGGTAAGTCTCCGATCTGTAT	91	120	75,7	36,2	0
				R: GGAATAGGTAGCACCTCTTTG	99				

Expressão observada com base no perfil dos marcadores moleculares cDNA-AFLP e MSAP

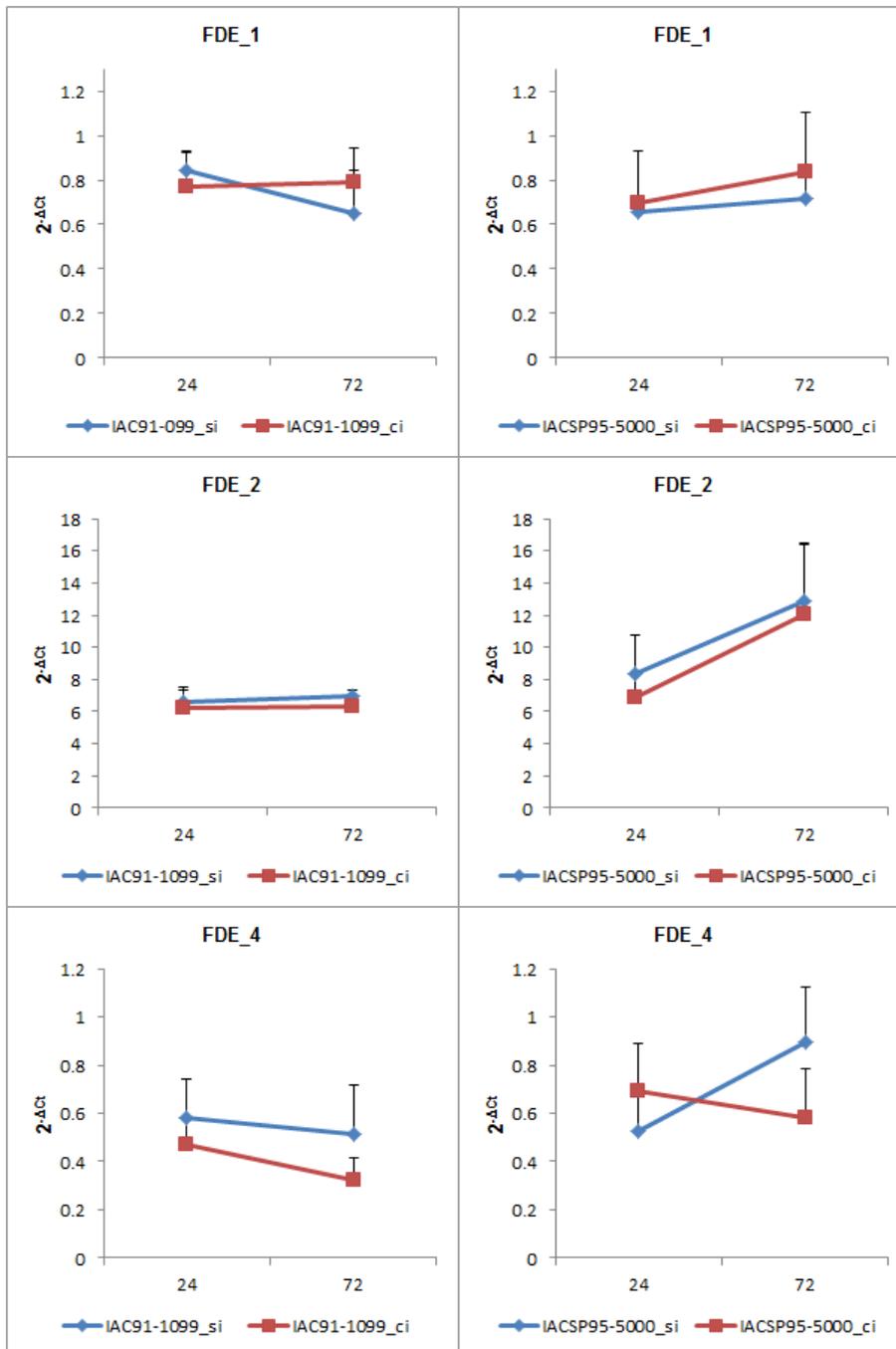


Figura 5. Dados de quantificação de expressão  $2^{-\Delta CT}$  e desvio padrão (SD) para os FDEs validados qRT-PCR para dois horários de coleta, 24 hai e 72 hai. O desvio padrão (SD) representa a variação entre as réplicas biológicas. Os motivos pfam associados aos FDEs são zf-CW, MBD; Clp\_N e VQ para FDE\_1, FDE\_2 e FDE\_4, respectivamente.

Tabela 13. Análise estatística pela ferramenta REST com  $p < 0,05$  (\*) e  $p < 0,01$ (\*\*) para os genótipos IAC91-1099 (1099) e IACSP95-5000 (5000).

		1099 si x ci <sup>a</sup>		5000 si x ci <sup>a</sup>		1099 x 5000 si <sup>b</sup>		1099 x 5000 ci <sup>b</sup>	
Réplica biológica		24 hai	72 hai	24 hai	72 hai	24 hai	72 hai	24 hai	72 hai
FDE_1	B1	NS	POS <sup>**</sup>	NS	POS <sup>*</sup>	NS	POS <sup>**</sup>	NS	POS <sup>**</sup>
	B2	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	B3	NEG <sup>*</sup>	NS	NEG <sup>*</sup>	NS	NEG <sup>*</sup>	NEG <sup>*</sup>	NS	NS
	<b>Média</b>	NS	NS	NS	NS	NEG <sup>**</sup>	NS	NS	NS
FDE_2	B1	NEG <sup>**</sup>	NEG <sup>**</sup>	NS	NS	NS	NS	NS	POS <sup>**</sup>
	B2	NS	NS	NS	POS <sup>**</sup>	NS	NS	NS	POS <sup>**</sup>
	B3	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	<b>Média</b>	NS	NEG <sup>*</sup>	NS	NS	NS	POS <sup>**</sup>	NS	POS <sup>**</sup>
FDE_4	B1	NS	NS	NS	NS	NS	POS <sup>**</sup>	NS	POS <sup>*</sup>
	B2	NS	NEG <sup>**</sup>	NS	NS	NS	POS <sup>*</sup>	POS <sup>*</sup>	POS <sup>*</sup>
	B3	NEG <sup>*</sup>	NS	NS	NS	POS <sup>*</sup>	POS <sup>**</sup>	POS <sup>**</sup>	NS
	<b>Média</b>	NS	NEG <sup>*</sup>	NS	NEG <sup>*</sup>	NS	POS <sup>**</sup>	POS <sup>*</sup>	POS <sup>*</sup>

a: Regulação positiva (POS), negativa (NEG) ou não significativa (NS) do tratamento com inoculação (c/i) em relação ao tratamento sem inoculação (s/i); b: Regulação positiva (POS), negativa (NEG) ou não significativa (NS) do cultivar IACSP95-5000 em relação a IAC91-1099.

## 5. DISCUSSÃO

A proporção de loci metilados observada pela contagem de padrões de presença e ausência de bandas MSAP (Tabela 2) variou de 33% a 35,4% para IAC91-1099, e de 33% a 37,3% para IACSP95-5000. Pela análise global das amostras pelo pacote R MSAP, foram observados 40% de MSL no genoma da cana-de-açúcar. Grativol et al. (2014), que aplicaram a técnica de filtragem de metilação no genoma da cana-de-açúcar, com o intuito de excluir sequências repetitivas, normalmente metiladas e pertencentes à heterocromatina, filtraram e excluíram 35% do genoma da cana-de-açúcar. Resultados obtidos pela aplicação de métodos enzimáticos em diferentes espécies vegetais foram reunidos por Alonso et al. (2016), demonstrando níveis de metilação de 17-27% no motivo CpHpG e de 30-41% no motivo CpG para *Brassica oleracea* (SALMON et al., 2008), enquanto *Zea mays* apresentou níveis de metilação de 30-50% no motivo CpHpG e 0% para CpG (PAPA et al., 2001), sendo resultados semelhantes aos do presente estudo.

Segundo Chad e Robert (2013), as espécies vegetais possuem mecanismos robustos para a manutenção das marcas de metilação no DNA, no entanto, mudanças no padrão de metilação podem ser ocasionadas em resposta a estresses (MIROUZE; PASZKOWSKI, 2011; IWASAKI; PASZKOWSKI, 2014) possuindo possíveis implicações na imunidade vegetal (LAW; JACOBSEN, 2010). Os resultados da Tabela 3, onde foi observada uma alta frequência de loci não alterados com tempo de coleta e inoculação com SCMV, e a análise PCoA (Figura 4), onde houve sobreposição dos grupos s/i e c/i em MSL para ambos os cultivares, parecem refletir esses mecanismos de manutenção.

Os índices de diversidade de Shannon e os valores de Phi\_ST, obtidos em análises AMOVA, indicam uma maior variação entre os cultivares nos loci NML, representando variações genéticas, em comparação aos loci MSL, que representam as variações epigenéticas de metilação de DNA. Contudo, as alterações no padrão de metilação de DNA observadas nas Tabelas 2 e 3 apontam para um comportamento específico dos cultivares IAC91-1099 e IACSP95-5000 em resposta à infecção por SCMV.

As maiores frequências de polimorfismos de hipometilação para o cultivar IACSP95-5000 24 hai e 72 hai (Tabela 3) podem envolver loci LRR, relacionados à defesa, assim como o observado por Boyko et al. (2007) em *N. tabacum* 24 h após a inoculação com TMV. A hipometilação dos loci LRR apresenta correlação com o aumento de eventos de recombinação dentro dos genes de resistência contendo LRR (KOVALCHUK et al., 2003), acelerando os eventos de recombinação genética nesses loci (ENGLER; WENG; STORB, 1993). Porém, diferentemente do observado por Boyko et al. (2007), não foi observado o aumento nos níveis de metilação genômica nos cultivares avaliados no presente estudo, podendo ser essa distinção devido à espécie estudada. Isso é reforçado pelo fato de que dentre as cinco linhagens estudadas de *N. tabacum* sob interação com TMV, uma não apresentou aumentos significativos na metilação genômica (BOYKO et al., 2007).

A distribuição da metilação genômica em espécies vegetais ocorre de forma não aleatória, associando-se preferencialmente a transposons e DNA silenciado

(GOMÉZ-DÍAZ et al., 2012), sendo regulados pela metilação de DNA nos sítios CpHpG e CpHpH por meio de remodelação da cromatina em resposta a fatores ambientais (HASHIDA et al., 2006; ZEMACH et al., 2010; GENT et al., 2013). A metilação de citosinas também ocorre dentro de regiões codificantes (entre os códons de início e término da transcrição) e regiões promotoras, estando tipicamente associada ao motivo CpG, com implicações na expressão gênica diferencial (BOYKO et al., 2007; GREAVES et al., 2012). Enquanto a metilação de regiões promotoras possui associação negativa com a expressão gênica (SUZUKI; BIRD, 2008), os efeitos da metilação dentro de sequências gênicas na expressão são desconhecidos até o momento, havendo as hipóteses de associação a um estado reprimido do gene (SAHU et al., 2013), ao aumento da acurácia no “splicing” (SHUKLA et al., 2011) ou na prevenção de transcrição aberrante dentro de genes (ZILBERMAN et al., 2007; MAUNAKEA et al., 2010).

Os alinhamentos dos fragmentos MSAP e FDEs oriundos de cDNA-AFLP indicam alterações em resposta ao SCMV de vias que podem caracterizar respostas à infecção viral, além de uma conexão entre alterações no padrão de metilação e transcriptoma. O FDE 5000\_29 pode caracterizar um bom exemplo dessa conexão por se alinhar com um transcrito com domínios “CW-type Zinc Finger” (zf-CW) e domínio ligante ao grupo metil no motivo CpG (“Methyl-CpG binding domain”, MBD) (Tabela 8). A função putativa do domínio MBD consiste no reconhecimento e ligação a DNA metilado (PERRY; ZHAO, 2003; ZEMACH; GRAFI, 2007), sendo inclusive um componente do processo de demetilação por mecanismos ativos em *A. thaliana* (LI et al., 2015). Entretanto, as proteínas MBD parecem ter se divergido evolutivamente nas monocotiledôneas, podendo possuir outras funções como ligação à RNA ou DNA não metilado, de forma que ainda não foram caracterizadas (ZEMACH; GRAFI, 2007). De acordo com He et al. (2010), a estrutura terciária do domínio zf-CW se assemelha a dedos de PHD (“Plant Homeodomain-finger”, PHD-finger), o qual possui importante função no reconhecimento da cauda da histona 3 (H3). Dessa forma, a presença desse domínio zf-CW reforça o possível papel de alterar a expressão de genes do transcrito alinhado a 5000\_29, uma vez que modificações na histona 3 (H3) podem levar à ativação de genes ou a um estado reprimido da

cromatina (RAPP; WENDEL, 2005; GOMÉZ-DÍAZ et al., 2012).

A proximidade de ilhas CpG e repetições em tandem à montante de regiões promotoras é considerada um indicativo da influência da metilação de DNA na expressão desses genes (DOS SANTOS et al., 2013; SZYMCZYK et al., 2017). Isso foi observado para os FDEs 5000\_20, 5000\_21, 5000\_24, 5000\_25, 5000\_28, 5000\_29, 1099\_32, 1099\_33 e 5000\_34, sugerindo essa conexão (Tabela 9). De modo similar, os fragmentos MSAP que se alinharam a transcritos 1099\_03, 5000\_10, 5000\_13, 5000\_14, 5000\_16 e 5000\_18 apresentam ilhas CpG próximas às regiões 5'UTR (Tabela 6).

Os FDEs 5000\_26, 5000\_31 e 5000\_32 também podem ser influenciados por vias epigenéticas, mesmo não possuindo proximidade com ilhas CpG ou repetições em tandem, devido a presença dos motivos reguladores AT-Hook e Homeodomain, (Tabela 9) envolvidos na metilação de DNA e remodelação da cromatina (SANCHEZ; ZHOU, 2011; XU; GAN; ITO, 2013). De forma similar, o fragmento MSAP 5000\_05 não apresentou proximidade com ilhas CpG ou repetições em tandem, mas possui o motivo regulador Homeodomain (Tabela 6). Enquanto as sequências promotoras em vertebrados se encontram com frequência dentro de ilhas CpG, estas não são facilmente distinguíveis em espécies vegetais (PIKAARD; SCHEID, 2014), deste modo, as alterações no padrão de metilação sem a proximidade de ilhas CpG são esperadas.

Dentre os fragmentos MSAP polimórficos originados da hipometilação (Tabela 5), o fragmento 5000\_05 apresentou um alinhamento com transcrito que contém um motivo pfam Myb\_DNA-binding, sendo relevante, uma vez que este motivo pertence a uma grande família de fatores de transcrição envolvida no controle de diversos processos como respostas a estresses bióticos e abióticos, desenvolvimento, diferenciação, metabolismo, defesa, entre outras funções (AMBAWAT et al., 2013). O fragmento 5000\_10 apresentou hit com uma proteína similar ao citocromo P450 no banco phytozome (Tabela 5), sendo o domínio p450 de grande importância para síntese de diversos compostos secundários em espécies vegetais superiores (DONALDSON; LUSTER, 1991). Genes pertencentes a essa superfamília também

foram observados como responsivos a estresses bióticos e abióticos (NARUSAKA et al., 2004), sendo inclusive um polimorfismo obtido com a técnica MSAP em *Brassica napus* sob condições de estresse salino (MARCONI et al., 2013). O motivo regulador bHLH, presente na região promotora de 5000\_10, possui funções de regulação de vias para adaptação a estresses (XU et al., 2014) e sinalização por fitormônios (SEO et al., 2011), reforçando a função de respostas a estresses bióticos e abióticos do transcrito alinhado.

O fragmento hipometilado 1099\_03 apresentou htis com transcritos bem similares nos dois bancos de dados utilizados na Tabela 5, sendo o BLASTN entre ambos os transcritos altamente significativo (e-value=0, identidade=97%, query cover=99%; dados não mostrados). De acordo com a descrição no Phytozome, trata-se de uma proteína similar a uma proteína putativa mei2-like do gênero *Arabidopsis* (“*Arabidopsis* Mei2-like 1”, AML1). As funções dessa proteína envolvem a meiose em espécies vegetais, desenvolvimento (KAUR; SEBASTIAN; SIDDIQI, 2006), e regulação gênica pós-transcricional por modificação na cromatina (BAURLE et al., 2008). Enquanto a proximidade com ilha CpG corrobora a possível função de regulação gênica pós-transcricional, o motivo regulador GATA indica funções em uma ampla gama de processos biológicos, incluindo desenvolvimento e florescimento (BEHRINGER; SCHWECHHEIMER, 2015), estando de acordo com a descrição no phytozome de proteína AML1. O motivo regulador NAC;NAM, por seu turno, indica funções de resposta a estresses bióticos e abióticos em espécies vegetais (NURUZZAMAN; SHARONI; KIKUCHI, 2013).

Dentre os fragmentos que foram hipermetilados após a inoculação com SCMV (Tabela 5), o fragmento 5000\_14 apresentou domínios pfam TAXI\_N e TAXI\_C que são descritos como inibidores de xilanase, possuindo participação na defesa vegetal (DORNEZ et al., 2010). A região reguladora desse transcrito possui o motivo bZIP que é responsivo a estresses bióticos e abióticos (ALVES et al., 2013), reforçando sua possível função na defesa em cana-de-açúcar. O fragmento 5000\_13 se alinhou com um transcrito cuja proteína possui domínio pfam PTR2, com papel no transporte de peptídeos (WATERWORTH; BRAY, 2006) e funções na interação patógeno hospedeiro (DIETRICH et al., 2004). A região reguladora desse transcrito

também reforça as funções de resposta a estresses sugerida pelo motivo pfam, por apresentar o motivo CG-1. Em *A. thaliana*, sistemas CAMTA/CG-1 têm demonstrado papel fundamental na resposta de estresses bióticos e abióticos (DOHERTY et al., 2009).

De acordo com a Tabela 5, a hipermetilação também foi observada para elementos transponíveis. O fragmento MSAP 5000\_16 se alinhou com transcrito que possui domínios de transcriptase reversa (RVT), frequentemente associados a retrotransposons (XIONG; EICKBUSH, 1990). Os elementos transponíveis possuem importante papel na alteração do perfil de metilação, principalmente pela via RdDM, umas das principais vias envolvendo pequenos RNAs interferentes em espécies vegetais. Nela, estresses de natureza biótica e abiótica podem promover a perda de metilação de elementos transponíveis, sua dispersão e um novo processo RdDM, alterando assim a distribuição da metilação genômica (MATZKE; MOSHER, 2014). A região promotora desse transcrito alinhado a 5000\_16 possui os motivos reguladores bZIP, reforçando a ideia que estresses bióticos alteram sua atividade, e Homeodomain, sugerindo alterações no padrão de metilação e estrutura da cromatina como descrito na via RdDM.

A ativação de elementos transponíveis e sequências repetitivas podem afetar a estabilidade do genoma e aumentar o potencial adaptativo do hospedeiro (ROMANEL et al., 2012). O fragmento MSAP 5000\_18 é um indicativo desse aumento de potencial adaptativo, uma vez que se alinhou a parte de domínio de retrotransposon em um transcrito que também possui domínio ligante a nucleotídeos (NB\_ARC), um dos principais componentes da imunidade vegetal induzida por efetores (“effector triggered immunity”, ETI) (Tabela 5). Exemplos da integração de elementos transponíveis a genes de resistência em ETI, conhecidos como genes R, já foram relatadas (DELERIS; HALTER; NAVARRO, 2016; SARRIS et al., 2016), possuindo possível papel na diversidade e função desses genes (FREELING et al., 2008). Os elementos reguladores presentes na região promotora do transcrito, NAC;NAM, bHLH e bZIP, relacionados a adaptação a estresses bióticos e abióticos e sinalização por fitormônios (ALVES et al., 2013; NURUZZAMAN; SHARONI; KIKUCHI, 2013; XU et al., 2014), são indicativos da possível função de resposta à

infecção viral.

A análise das regiões promotoras dos alinhamentos MSAP intergênicos revela possíveis efeitos da metilação de DNA na expressão de genes à jusante, uma vez que motivos reguladores foram observados dentro da sequência MSAP, estando todos os alinhamentos dentro de ilhas CpG (Tabela 7). A hipometilação observada em 1099\_01 e 1099\_02 envolve os motivos reguladores bHLH e AT-Hook, podendo possuir efeitos de regulação positiva no transcrito relacionado a proteínas kinase, motivo pfam Pkinase\_Tyr, que é envolvido em vias de sinalização de estresses bióticos e abióticos (JALMI; SINHA, 2016). Além da regulação da expressão envolvendo a adaptação a estresses e sinalização por fitormônios, indicada pela presença do motivo bHLH (SEO et al., 2010; XU et al., 2014), mecanismos epigenéticos também podem estar envolvidos devido a presença do motivo AT-Hook (XU; GAN; ITO, 2013). Para o cultivar IACSP95-5000, foi observada a hipermetilação à montante do mesmo transcrito, pelo fragmento 5000\_17, com os mesmos elementos reguladores dentro da sequência MSAP. Além dos horários de coleta e a forma de polimorfismo MSAP, a distinção entre os cultivares para este transcrito parece estar na proximidade da ilha CpG à região 5'UTR, sendo esta maior em 5000\_17, sugerindo diferenças epigenéticas entre os cultivares nesta via envolvida.

Os polimorfismos de hipometilação 1099\_04 e 5000\_09 sugerem a ativação de elementos transponíveis, enquanto a hipermetilação em 5000\_19 sugere um novo silenciamento. Os elementos reguladores bZIP e bZIP;Homeodomain;HD-ZIP são responsivos a estresses bióticos e abióticos (Tabela 7) (YU et al., 2005; ALVES et al., 2013), novamente sugerindo o envolvimento de vias RdDM (MATZKE; MOSHER, 2014). A técnica cDNA-AFLP também indicou alterações na atividade de elementos transponíveis após a infecção viral, com o fragmento 5000\_20 indicando regulação positiva de um retrotransposon 24 hai.

Os domínios pfam e os motivos reguladores dos fragmentos cDNA-AFLP restantes indicam diferentes vias moleculares envolvidas na resposta à infecção ocasionada pelo SCMV (Tabela 8). O FDE 5000\_21 se alinhou com transcrito com

dois domínios pfam kelch\_1. Resultados BlastX desse transcrito revelam similaridade com proteínas F-box com repetições kelch, a exemplo da proteína de sorgo de acesso XP\_021301994.1 no NCBI, cuja cobertura foi de 56%, e-value de  $1e-64$  e identidade de 98% (dados não mostrados). Repetições do motivo kelch estão entre os motivos mais comumente encontrados em proteínas F-box de milho (JIA et al., 2013) e *Arabidopsis* (KURODA et al., 2002). Um número crescente de proteínas F-box vem sendo descrito, e as funções destas proteínas vem se tornando cada vez mais diversa, abrangendo percepção hormonal, sinalização, proteção contra estresses, remodelação de cromatina, ciclos circadianos, auto-incompatibilidade e defesa contra patógenos (LECHNER et al. 2006; HUA; SHIU; VIERSTRA, 2011). O elemento regulador Dof da região promotora deste transcrito (Tabela 9) também apresenta funções diversas na expressão gênica vegetal como respostas a luz, fitormônios e respostas de defesa, desenvolvimento de semente e germinação (YANAGISAWA, 2002).

O FDE 5000\_22 apresentou alinhamento significativo com transcritos de proteína coletora de luz do fotossistema II (PSII) no banco de dados do CTBE, e de fosfoproteína de 10 kDa do fotossistema II (PsbH) no Phytozome (tabela 8). Os efeitos da infecção por vírus do gênero *Potyvirus* em proteínas do fotossistema II já foram observados em outros estudos (DÍAZ-VIVANCOS et al., 2008; BAEBLER et al., 2009). Baebler et al. (2009) observaram em análises de microarranjo regulação positiva de transcritos relacionados a domínios PSII em ambos os cultivares de batata de resposta contrastante ao *Potato virus Y* (PVY), meia hora após a inoculação. Em outra abordagem, Díaz-Vivancos et al. (2008) observaram efeitos da infecção por *Plum pox virus* (PPV) sobre o fotossistema II por meio de alterações na quantidade de Rubisco, intensificadores responsivos a oxigênio e fatores de estabilidade do fotossistema II, levando a formação de espécies reativas de oxigênio ("Oxygen reactive species", ROS), e correlacionaram o estresse oxidativo gerado pelos cloroplastos aos sintomas ocasionados pela infecção viral em ervilha. Enquanto grandes quantidades de ROS causam danos celulares, pequenas quantidades podem agir como moléculas sinalizadoras (GILL; TUTEJA, 2010), o que ressalta a possível função de sinalização dos cloroplastos. Essa função vem sendo

descrita recentemente como vias de sinalização retrógrada, a qual promove alteração da expressão gênica com base na sinalização dos cloroplastos, apresentando função de respostas a alterações do ambiente e em vias de defesa contra patógenos (BOBIK; BURCH-SMITH, 2015).

Outro motivo relacionado à fotossíntese foi o da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPCase), com papel na assimilação de CO<sub>2</sub> atmosférico durante a fotossíntese C4 e pelo metabolismo ácido das crassuláceas (O'LEARY; PARK; PLAXTON, 2011). Os fragmentos 5000\_31, regulado positivamente 72 hai, e o 5000\_35, regulado negativamente 24 hai, sugerem modificações no processo de fotossíntese em resposta ao SCMV (Tabela 8). Muller et al. (2009) observaram a regulação positiva de PEPCase em fumo sob infecção com os *Potyvirus Potato virus A* e *Potato virus Y*. Segundo os autores, a regulação positiva de PEPCase pode ser devido ao fechamento de estômatos e subsequente alteração de metabolismo, e também ao aumento do fluxo anaplerótico necessário para sustentar a síntese de proteínas de defesa à vírus.

Os FDEs 5000\_23, 5000\_24 e 5000\_25, regulados positivamente de acordo com a análise de perfil de CDNA-AFLP, apresentaram alinhamento com transcritos com domínios relacionados à chaperonas moleculares (“caseinolytic protease”, Clp) da classe Hsp 100 (“Heat Shock Protein 100”) e proteases dependentes de ATP (“ATPases associated with diverse cellular activities”, AAA) (Tabela 8) (RIGAS et al., 2014; WANG et al., 2004). Enquanto as chaperonas moleculares facilitam o dobramento correto de proteínas recém-sintetizadas, prevenindo a agregação e auxiliando na montagem de complexos multiprotéicos, as proteases AAA degradam proteínas que foram danificadas de modo irreparável ou sintetizadas erroneamente (RIGAS et al., 2014). Agarwal et al. (2003) observaram correlação entre proteínas de arroz Hsp 100 e o desaparecimento de grânulos protéicos em células transformadas de levedura na fase pós-estresse, sugerindo uma função na recuperação do estresse celular. A região promotora desses transcritos possuem os elementos reguladores Dof, Ap2, bZIP e WRKY que reforçam as funções descritas dos domínios pfam (Tabela 9). O motivo regulador Ap2, pertencente à superfamília de fatores de transcrição “APETALA2/Ethylene-Responsive Factor” (AP2/ERF), é

responsável pela regulação de respostas fisiológicas, desenvolvimento e resposta a estresses (LICAUSI; TAKAGI; PERATA, 2013), sendo também observado em 5000\_29. A observação de sítio WRKY remete os resultados observados por Baebler et al. (2009), possuindo funções relevantes de respostas de defesa por mediação da sinalização por etileno e ácido abscísico, observado em *A. thaliana* por Chen et al. (2013).

O FDE 5000\_30 apresentou alinhamento com a região intrônica de Sobic.002G370900.1, enquanto o transcrito do CTBE SP803280\_c102182\_g1\_i2 não apresentou similaridades pela ferramenta BlastX, com exceção da região genômica e em parte da região transcrita de Sobic.002G370900.1, podendo se tratar de um transcrito ainda não caracterizado (Tabela 8). O domínio pfam associado à região transcrita de Sobic.002G370900.1 corresponde a uma protease da família “Prolyl oligopeptidase” (TRIPATHI; SOWDHAMINI, 2006) que, segundo a descrição no site da EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/>), é conhecida por formar complexos com Clp ATPases.

O fragmento 5000\_26 se alinhou com um transcrito com dois motivos pertencentes à família de oxirredutases GFO/IDH/MOCA, sendo que um desses motivos pfam também possui estrutura secundária ligante a “NAD(P) Rossmann-fold” (Tabela 8). Estudos em condições de estresse biótico também revelaram regulação positiva de proteínas “Rossmann fold” em associação com resistência de trigo a *Fusarium graminearum* (ZHANG et al., 2013b) e em feijão em resposta à infecção por *Uromyces appendiculatus*, juntamente com proteínas de resistência (AYYAPPAN et al., 2015).

Os fragmentos 5000\_28, 1099\_32 e 1099\_33 possuem alinhamentos com proteínas HIPPs (“heavy metal-associated isoprenylated plant proteins”) (Tabela 8), que são “metallochaperonas” com um ou dois domínios conservados HMA (SUZUKI et al., 2002; BARTH et al., 2009), e que são componentes chave para o transporte de íons metálicos para o meio intracelular (ABREU-NETO et al., 2013). Proteínas HIPPS possuem funções descritas de homeostase de metais pesados e desintoxicação (CHANDRAN et al., 2008; TEHSEEN et al., 2010) e também como

elementos regulatórios na resposta transcricional a estresses abióticos como frio e seca (BARTH et al., 2004; BARTH et al., 2009). Assim como observado por Agudelo-Romero et al. (2008), a infecção por *Potyvirus* pode induzir genes do hospedeiro envolvidos em respostas à estresses abióticos como seca, salinidade, altas temperaturas e injúria mecânica. A presença dos motivos bZIP e AT-Hook na região promotora indicam a resposta a estresses (ALVES et al., 2013) e a regulação por mecanismos epigenéticos (XU; GAN; ITO, 2013), corroborando com a proximidade de ilhas CpG como indicativo da metilação diferenciada (Tabela 9) (DOS SANTOS et al., 2013; SZYMCZYK et al., 2017).

O FDE 5000\_34, regulado negativamente 24 hai, se alinhou a um transcrito potencialmente relacionado a proteínas transmembrana, previamente descrita em animais (Tabela 8). Em mamíferos, proteínas sinaptotagmina (“Synaptotagmins”, SYT) ligam-se a íons  $Ca^{2+}$  e interagem com fosfolípidos e proteínas da maquinaria de fusão de membranas para regulação da fusão de vesículas na membrana plasmática com a finalidade de exocitose de neurotransmissores e hormônios (MOGHADAM; JACKSON, 2013). Em *Arabidopsis thaliana*, cinco proteínas sinaptotagminas foram descritas (SYTA, SYTB, SYTC, SYTD e SYTE), todas preditas como possuindo a estrutura de domínios protéicos conservada em relação aos seus ortólogos em animais. A proteína SYTA é a mais bem estudada e tem demonstrado importantes funções em estresses bióticos e abióticos (LEWIS; LAZAROWITZ, 2010). Uchiyama et al. (2014) constataram que SYTA regula o transporte mediado por proteínas de movimento codificadas por vírus (“movement protein”, MP) via plasmodesma (PD) em vírus diversos como *Cabbage leafcurlvirus* (CaLCuV), do gênero *Begomovirus* e TMV, do gênero *Tobamovirus*, sugerindo um papel central dessas proteínas na regulação do movimento célula a célula de uma ampla gama de fitovírus. Para os vírus que empregam outros mecanismos de transporte e que, diferentemente de CaLCuV e TMV, infectam de forma eficiente *A. thaliana*, como o potyvírus *Turnip mosaic virus* (TuMV) e o tobamovírus *Turnip vein clearing virus* (TVCV), a infecção sistêmica apresentou atraso nas linhagens de *A. thaliana* com SYTA silenciado (SYTA knockdown line, *syta-1*) em relação as linhagens selvagens (UCHIYAMA et al., 2014). A análise da região promotora indica

a regulação deste transcrito por vias epigenéticas como metilação de DNA e remodelação da cromatina devido à presença do motivo Homodomain e proximidade com ilha CpG (Tabela 9).

A análise REST da expressão dos três genes candidatos indicam comportamentos diferentes do observado pela técnica cDNA-AFLP (Tabela 13). O perfil de expressão do FDE\_4 (Figura 5), o qual se refere a um transcrito com motivo pfam VQ, demonstra uma tendência de regulação positiva em c/i no cultivar IACSP95-5000 24 hai e uma regulação negativa mais pronunciada em c/i 72 hai que no cultivar IAC91-1099, ainda assim a abundância deste transcrito foi superior em IACSP95-5000. As proteínas VQ regulam diversos processos de desenvolvimento e incluem respostas a estresses bióticos e abióticos (JING; LIN, 2015). A regulação negativa do transcrito VQ no cultivar resistente se assemelha ao observado por Cassone et al. (2014) em análises de microarranjo de linhagens contrastantes de milho sob infecção com MDMV. Os níveis de transcrito referentes à chaperonas moleculares, representados pelo FDE\_2, indicam maiores expressões no cultivar resistente IACSP95-5000 72 hai para ambos os tratamentos (Tabela 13, Figura 5). As funções de proteínas chaperonas da classe HSP100 na imunidade vegetal têm sido pouco investigadas (PARK; SEO, 2015), mas as possíveis funções de recuperação pós-estresse e qualidade proteica podem explicar a ausência de sintomas de mosaico no cultivar resistente IACSP95-5000 (AGARWAL et al., 2003; RIGAS et al., 2014). A correlação das diferenças na expressão do FDE\_2 com os sintomas ocasionados pelo mosaico da cana-de-açúcar é reforçada por Sjögren et al. (2004), que observaram atrasos no crescimento, clorose foliar e diminuições na fotossíntese com o silenciamento do gene *clpC1* em *A. thaliana*, o qual é responsável pela codificação de proteínas chaperonas Hsp100 em cloroplastos.

Diferenças entre observações de análise de transcriptoma e validação em tempo real estão presentes na literatura (UŻAROWSKA et al., 2009; GUSBERTI; GESSLER; BROGGINI, 2013; BASTIAANSE et al., 2014). Bastiaanse et al. (2014) ao validarem 24 FDEs responsivos a patógenos em um cultivar de maçã sob infecção com o fungo *Venturia inaequalis*, observaram que 17% deles não estavam de acordo com o observado pela técnica cDNA-AFLP e não apresentaram

expressão diferencial significativa nas análises de qRT-PCR. Gusberti, Gessler e Brogгинi (2013) ao analisarem o transcriptoma por RNA-seq em maçã também sob inoculação com *V. inaequalis*, observaram a regulação positiva significativa para o gene “Lipoxigenase” (LOX), o qual está envolvido na via de síntese do fitormônio jasmonato, ao passo que os resultados qRT-PCR revelaram alterações na expressão não significativas. Użarowska et al. (2009) ao validarem genes candidatos obtidos por análise de microarranjo para resistência ao SCMV e MDMV em linhagens puras de milho, não observaram expressão diferencial significativa para os genes de RNA ribossomal 26S e sintase de S-adenosilmetionina ao empregarem a média de quatro réplicas biológicas, mas com aumentos significativos de 1,2 e 1,6 vezes na expressão em uma das réplicas, enquanto o gene “14-3-3-like protein GF14-6” não foi validado em nenhuma réplica biológica.

Analisando individualmente os resultados de validação do presente trabalho, foi possível observar para o FDE\_2 regulação positiva a 1% de probabilidade para IACSP95-5000 72 hai na réplica biológica 2 (Tabela 13), sugerindo uma reprodução do observado em cDNA-AFLP por Medeiros et al. (2014). No FDE\_1 foi observado a regulação negativa 24 hai na réplica biológica 3 e regulação positiva 72 hai na réplica biológica 1 para ambos os cultivares (Tabela 13). Por possuir alinhamento com transcrito de motivos pfam zf-CW e MBD, sua expressão pode estar relacionada a polimorfismos MSAP observados para ambos os cultivares (HE et al., 2010; WANG et al., 2015). A regulação positiva do FDE\_1 72 hai em IACSP95-5000 pode refletir o aumento na frequência dos polimorfismos de hipometilação +/-/++, os quais aumentaram de 11 para 32 loci. Enquanto no cultivar IAC91-1099 são os polimorfismos de hipometilação --/+ que parecem ser resultantes desse aumento na expressão do FDE\_1, uma vez que aumentaram de 6 para 21 loci (Tabela 3).

Tendo em vista as vias de defesa das espécies vegetais a vírus mencionadas por Nicaise (2014), o FDE 5000\_34, regulado negativamente de acordo com o marcador molecular cDNA-AFLP, sugere uma forma de resistência recessiva ao SCMV, ainda que proteínas SYTA não tenham sido mencionadas na revisão em questão. A resistência de herança dominante, relacionada a genes R, é representada pelo fragmento MSAP 5000\_17 que provavelmente envolveu uma inserção de

retrotransposon em um gene R, havendo possíveis implicações da metilação de DNA na regulação de sua transcrição (DELERIS; HALTER; NAVARRO, 2016). Por fim, a sinalização por fitormônios é sugerida por elementos reguladores presentes nas regiões promotoras, que foram identificadas a partir de alinhamentos com os fragmentos MSAP 5000\_10, 5000\_18, 1099\_01 e 1099\_02, assim como com o fragmento cDNA-AFLP 5000\_21.

## **6. CONCLUSÃO**

Os resultados do presente trabalho indicam modificações no padrão de metilação de DNA em resposta ao SCMV, sendo estas específicas aos cultivares em estudo. Mesmo representando uma pequena proporção dos loci MSAP totais investigados, os alinhamentos dos polimorfismos sugerem funções relevantes como resposta a estresses e atividade de elementos transponíveis, com possível atuação de elementos reguladores também responsivos a estresses, assim como a fitormônios e mecanismos epigenéticos. Os alinhamentos dos FDEs demonstram alterações no transcriptoma envolvendo vias de fotossíntese, qualidade protéica, respostas à estresse, atividade de elementos transponíveis além de conexões com vias epigenéticas. Os resultados de validação por qRT-PCR apontaram para uma complexidade na expressão dos FDEs investigados devido à variação entre as réplicas biológicas. No entanto, as análises REST e perfil de expressão permitiram traçar paralelos com a resposta contrastante dos cultivares em estudo ao SCMV, possivelmente compreendendo as diferenças no padrão de metilação de DNA e no desenvolvimento de sintomas.

## 7. REFERÊNCIAS

ABID, G.; MINGEOT, D.; MUHOVSKI, Y.; MERGEAI, G.; AOUIDA, M.; ABDELKARIM, S.; AROUA, I.; EL AYED, M.; M'HAMDI, M.; SASSI, K.; JEBARA, M. Analysis of DNA methylation patterns associated with drought stress response in faba bean (*Vicia faba* L.) using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). **Environ. Exp. Bot.**, 142, p. 34–44. 2017. Disponível em: <10.1016/j.envexpbot.2017.08.004>.

ACOSTA-LEAL, R.; XIONG, Z. Complementary functions of two recessive R-genes determine resistance durability of tobacco “Virgin A Mutant” (VAM) to potato virus Y. **Virology** 379, p. 275–283. 2008. Disponível em: < 10.1016/j.virol.2008.06.026>.

ADIE, B. A. T.; PEREZ-PEREZ, J.; PEREZ-PEREZ, M. M.; GODOY, M.; SANCHEZ-SERRANO, J. J.; SCHMELZ, E.A.; SOLANO, R. ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*, **The Plant Cell**, v.19, p. 1665-1681. 2007.

AGARWAL, M.; SAHI, C.; KATIYAR-AGARWAL, S.; AGARWAL, S.; YOUNG, T.; GALLIE, D. R.; SHARMA, V. M.; GANESAN, K.; GROVER, A. Molecular characterization of rice HSP101: complementation of yeast hsp104 mutation by disaggregation of protein granules and differential expression in indica and japonica rice types. **Plant Mol. Biol.** 51, p. 543–553. 2003.

AGBECI, M.; GRANGEON, R.; NELSON, R. S.; ZHENG, H.; LALIBERTE, J. F. Contribution of host intracellular transport machineries to intercellular movement of turnip mosaic virus. **PLoS Pathog** 9, e1003683. 2013.

AGIUS, F.; KAPOOR, A.; ZHU, J. K. Role of the Arabidopsis DNA glycosylase/lyase ROS1 in active DNA demethylation. **Proc Natl Acad Sci USA** 103, p. 11796–11801. 2006.

AGRAWAL, N.; DASARADHI, P. V.; MOHMMED, A.; MALHOTRA, P.; BHATNAGAR, R. K.; MUKHERJEE, S. K. RNA interference: biology, mechanism, and applications. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 67 p. 657-685. 2003.

AGUDELO-ROMERO, P.; CARBONELL, P.; DE LA IGLESIA, F.; CARRERA, J.; RODRIGO, G.; JARAMILLO, A.; PEREZ-AMADOR, M. A.; ELENA, S. F. Changes in the gene expression profile of *Arabidopsis thaliana* after infection with *Tobacco etch virus*. **Virology** 5, 92. 2008.

AHARONI, A. ; VORST, O. DNA microarrays for functional plant genomics. **Plant Molecular Biology**, vol. 48, no. 1-2, p. 99–118, 2002.

AITKEN, K. S.; McNEIL, M.D.; HERMANN, S.; BUNDOCK, P. C.; KILIAN, A.; HELLER-USZYNSKA, K.; HENRY, R. J.; LI, J. A comprehensive genetic map of sugarcane that provides enhanced map coverage and integrates high-throughput Diversity Array Technology (DArT) markers. **BMC Genomics**, p. 15-152, 2014.

AITKEN, K. S.; HERMANN, S.; KARNO, K.; BONNETT, G.D.; MCINTYRE, L. C.; JACKSON, P.A. Genetic control of yield related stalk traits in sugarcane. **Theor Appl Genet**. 117, p. 1191–203. 2008.

AITKEN, K. S.; JACKSON, P. A.; MCINTYRE, C.L. Construction of a genetic linkage map for *Saccharum officinarum* incorporating both simplex and duplex markers to increase genome coverage. **Genome**, 50, p. 742-756. 2007. Disponível em: <10.1139/G07-056>.

AITKEN, K. S.; JACKSON, P. A.; MCINTYRE, C. L. A combination of AFLP and SSR markers provides extensive map coverage and identification of homo(eo)logous linkage groups in a sugarcane cultivar. **Theor Appl Genet**, 110, p. 789–801. 2005. Disponível em: <10.1007/s00122-004-1813-7>.

AKIMOTO, K.; KATAKAMI, H.; KIM, H.J.; OGAWA, E.; SANO, C. M.; WADA, Y.; SANO, H. Epigenetic inheritance in rice plants. **Ann Bot (Lond)**; 100(2), p. 205–17, 2007.

AL-JANABI, S. M.; HONEYCUTT, R. J.; McCLELLAND, M.; SOBRAL, B. W. S. A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* L. '**SES208**' **Genetics**, 134, p. 1249–1260. 1993.

AL-JANABI, S. M.; HONEYCUTT, R.J.; SOBRAL, B. W. S. Phylogenetic analysis of organellar DNA sequences in the *Andropogoneae*: *Saccharinae*. **Theor Appl Genet**, 88, p. 933–944. 1994.

ALA-POIKELA, M.; GOYTIA, E.; HAIKONEN, T.; RAJAMAKI, M. L.; VALKONEN, J. P. Helper component proteinase of the genus *Potyvirus* is an interaction partner of translation initiation factors eIF(iso)4E and eIF4E and contains a 4E binding motif. **J Virol** 85, p. 6784–6794. 2011.

ALAZEM, M.; LIN, N. S. Roles of plant hormones in the regulation of host– virus interactions. **Mol. Plant Pathol.** 16, p. 529–540. 2015.

ALAZEM, M.; LIN, K. Y.; LIN, N. S. The abscisic acid pathway has multi- facete defects on the accumulation of bamboo mosaic virus. **Mol. Plant Microbe Interact.** 27, p. 177–189. 2014. Disponível em: <10.1094/MPMI-08-13-0216-R>.

ALI, S. S.; GUNUPURU, L. R., KUMAR, G. B., KHAN, M., SCOFIELD, S., NICHOLSON, P.; DOOHAN, F. M. Plant disease resistance is augmented in uzu barley lines modified in the brassinosteroid receptor BR1. **BMC Plant Biol.** 14, p. 227. 2014. Disponível em: <10.1186/s12870-014- 0227-1>.

ALONSO, C.; PÉREZ, R.; BAZAGA, P.; MEDRANO, M.; HERRERA, C. M. MSAP markers and global cytosine methylation in plants: a literature survey and comparative analysis for a wild-growing species. **Molecular Ecology Resources**, 16, p. 80-90. 2016.

ALVES, M. S.; DADALTO, S. P.; GONÇALVES, A. B.; DE SOUZA, G. B.; BARROS, V. A.; FIETTO, L. G. Plant bZIP Transcription Factors Responsive to Pathogens: A Review. *Int J Mol Sci.*, 14(4), p. 7815–7828. 2013. Disponível em: <10.3390/ijms14047815>.

AMBAWAT, S.; SHARMA, P.; YADAV, N. R.; YADAV, R. C. MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. **Physiol. Mol. Biol. Plants** 19, p. 307–321. 2013.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: model-based variance estimation to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Res.**, 64, p. 5245–5250. 2004. Disponível em: < 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>.

ANDRADE, L.M.; DOS SANTOS BRITO, M.; FÁVERO PEIXOTO JUNIOR, R.; MARCHIORI, P.E.R.; NÓBILE, P.M.; MARTINS, A.P.B.; RIBEIRO, R.V.; CRESTE S. Reference genes for normalization of qPCR assays in sugarcane plants under water deficit. **Plant Methods**. 2017 Apr 17;13:28. Disponível em: <10.1186/s13007-017-0178-2>.

ARCENEUX, G. Flowering of sugarcane. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 12., 1965, San Juan. **Anais...** Amsterdam: Elsevier, p. 780-784. 1967.

ASHIKAWA, I. Gene-associated CpG islands in plants as revealed by analyses of genomic sequences. **Plant J**. 26, p. 617-625. 10.1046/j.1365-313x.2001.01062.x. 2001a. Disponível em: <107, 8689-8694. 10.1073/pnas.1002720107>.

ASHIKAWA, I. Surveying CpG methylation at 50-CCGG in the genomes of rice cultivars. **Plant Mol Biol**; 45(1), p. 31–9, 2001b.

ASSELBERGH, B.; ACHUO, A. E.; HÖFTE, M.; VANGIJSEGEM, F. Abscisic acid deficiency leads to rapid activation of tomato defense responses upon infection with *Erwinia chrysanthemi*. **Mol. PlantPathol.** 9, p. 11-24. 2008. Disponível em: <10.1111/j.1364-3703.2007.00437.x>.

AUDENAERT, K.; DeMEYER, G. B.; HÖFTE, M. M. Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. **PlantPhysiol.** 128, p. 491–501. 2002. Disponível em: <10.1104/pp.010605>.

AYYAPPAN, V.; KALAVACHARLA, V.; THIMMAPURAM, J. Genome-wide profiling of histone modifications (H3K9me2 and H4K12ac) and gene expression in rust (*Uromyces appendiculatus*) inoculated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), **PLoS ONE**, vol. 10, no. 7, Article ID e0132176, 2015.

BABU, M.; GRIFFITHS, J. S.; HUANG, T. S.; WANG, A. Altered gene expression changes in *Arabidopsis* leaf tissues and protoplasts in response to *Plum pox virus* infection. **BMC Genomics** 9, 325. 2008.

BACHEM, C.W.; VAN DER HOEVEN, R.S.; DE BRUIJN, S.M.; VREUGDENHIL, D.; ZABEAU, M.; VISSER, R.G. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. **Plant J** 9, p. 745–753. 1996.

BACHEM, C. W. B.; OOMEN, R. J. F. J.; VISSER R. G. F. Transcript imaging with cDNA-AFLP: a step-by-step protocol. **Plant Molecular Biology Reporter**, vol. 16, no. 2, p. 157–173. 1998.

BAEBLER, S., KRECIC-STRES, H., ROTTER, A., KOGOVSEK, P., CANKAR, K., KOK, E. J., GRUDEN, K., KOVAC, M., ZEL, J.; POMPE-NOVAK, M.; RAVNIKAR, M. PVYNTN elicits a diverse gene expression response in different potato genotypes in the first 12 h after inoculation. **Mol Plant Pathol** 10, p. 263– 275. 2009.

BAIN, D.C. The use of abrassive for inoculating sugarcane seedlings with the mosaic virus. **Phytopathology**, 34, p. 844-845. 1944.

BANNISTER, A.J.; KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Research**, 21, p. 381–395. 2011.

BARBER, C. A. The classification of Indian Canes. **The International Sugar Journal**, 24, p. 18-20. 1922.

BARBOSA, M. H. P. Study of genetic divergence in sugarcane varieties grown in Brazil using the parentage coeficiente. **International Sugar Journal**, London, v. 103, n. 1231, p. 294-295. 2001.

BARBOSA, M. H. P; RESENDE, M. D. V; PETERNELLI, L. A.; BRESSIANI, J. A; SILVEIRA, L. C. I.; SILVA, F. L.; FIGUEIREDO, I. C. R. Use of REML/BLUP for the selection of sugarcane families specialized in biomass production. **Crop Breed Appl Biotechnol.**, 4, p. 218–26. 2004.

BARTH, O.; VOGT, S.; UHLEMANN, R.; ZSCHIESCHE, W.; HUMBECK, K. Stress induced and nuclear localized HIPP26 from Arabidopsis thaliana interacts via its heavy metal associated domain with the drought stress related zinc finger transcription factor ATHB29. **Plant Mol Biol** 69, p. 213–226. 2009.

BARTH, O.; ZSCHIESCHE, W.; SIERSLEBEN, S.; HUMBECK, K. Isolation of a novel barley cDNA encoding a nuclear protein involved in stress response and leaf senescence. **Physiol Plant** 121, p. 282–293. 2004.

BASTIAANSE, H.; MUHOVSKI, Y.; PARISI, O.; PARIS, R.; MINGEOT, D.; LATEUR, M. Gene expression profiling by cDNA-AFLP reveals potential candidate genes for partial resistance of 'Président Roulin' against *Venturia inaequalis*. **BMC Genomics** 15:1043. 2014.

BAURLE, I.; DEAN, C. Differential interactions of the autonomous pathway RRM proteins and chromatin regulators in the silencing of Arabidopsis targets. **PLoS One** 3: e2733. 2008.

BEADLE, C. L.; LONG, S. P. Photosynthesis - is it limiting to biomass production. **Biomass**. 8, p. 119-168. 1985. Disponível em: <10.1016/0144-4565(85)90022-8>.

BEHRINGER, C.; SCHWECHHEIMER, C. B-GATA transcription factors – insights into their structure, regulation, and role in plant development. *Front Plant Sci.*, 6:90. 2015. Disponível em: <10.3389/fpls.2015.00090>.

BERDING, N.; B. T. ROACH. Germoplasm collection, maintenance and use. In: HEINZ, D. J. **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier Press, p. 143-210. 1987.

BIGEARD, J.; COLCOMBET, J.; HIRT, H. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). **Mol Plant**. 8(4), p. 521–39. 2015.

BIRD, A.P.; SOUTHERN, E.M. Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation: I. The methylation pattern in ribosomal DNA from *Xenopus laevis*. **J Mol Biol** 118, p. 27–47, 1978

BOBIK, K.; BURCH-SMITH, T. M. Chloroplast signaling within, between and beyond cells. **Frontiers in plant science**. October 2015. Disponível em: < 10.3389/fpls.2015.00781>.

BOLLER, T.; FELIX, G. A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. **Annu. Rev. Plant Biol.** 60, p. 379–406. 2009.

BONDURIANSKY, R.; DAY, T. Nongenetic inheritance and its evolutionary implications. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics** 40, p. 103–125, 2009

BOTHA, A. M.; SWANEVELDER, Z. H.; LAPITAN, N. L. V. Transcript profiling of wheat genes expressed during feeding by two different biotypes of *Diuraphis noxia*. **Environ Entomol** 39, p. 1206–1231. 2010.

BOYKO, A.; KATHIRIA, P.; ZEMP, F. J.; YAO, Y.; POGRIBNY, I.; KOVALCHUK, I. Transgenerational changes in the genome stability and methylation in pathogen-infected plants (virus-induced plant genome instability). **Nucleic Acids Res.** 35, p. 1714–25. 2007.

BREMER, G. Problems in breeding and cytology of sugar cane. **Euphytica** 10, p. 59–78. 1961.

BRESSIANI, J. A. **Seleção seqüencial em cana-de-açúcar**. 2001. 133 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

BRINKMAN, A. B.; SIMMER, F.; MA, K.; KAN A.; ZHU, J.; STUNNENBERG, H. G. Whole-genome DNA methylation profiling using MethylCap-seq. **Methods** 52, p. 232–236. 2010.

BROWN, R. H. A difference in N use efficiency in C3 and C4 plants and its implications in adaptation and evolution. **Crop Sci.** 18, p. 93-98. 1978.

BUTTERFIELD, M. K.; RUTHERFORD, R. S.; CARSON, D. L.; HUCKETT, B. I. Application of gene discovery to varietal improvement in sugarcane. **South African Journal of Botany**, v. 70, n.1, p. 167-172, 2004.

CARANTA, C.; LEFEBVRE, V.; PALLOIX, A. Polygenic resistance of pepper to potyviruses consists of a combination of isolate-specific and broad-spectrum quantitative trait loci. **Mol. Plant Microbe Interact.** 10, p. 872–878. 1997. Disponível em: <10.1094/MPMI.1997.10.7.872>.

CARRINGTON, J. C.; JENSEN, P. E.; SCHAAD, M. C. Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. **Plant J** 14, p. 393–400. 1998.

CARSON, D. L.; BOTHA, F. C. Preliminary analysis of expressed sequence tags for sugarcane. **Crop Sci** 40, p. 1769–1779. 2000.

CASSONE, B. J.; CHEN, Z.; CHIERA, J.; STEWART, L. R.; REDINBAUGH, M. G. Responses of highly resistant and susceptible maize to vascular puncture inoculation with Maize dwarf mosaic virus. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 86, p. 19–27. 2014.

CASU, R. E.; GROF, C. P. L.; RAE, A. L.; MCINTYRE, C. L.; DIMMOCK, C.M.; MANNERS, J. M. Identification of a novel sugar transporter homologue strongly expressed in maturing stem vascular tissues of sugarcane by expressed sequence tag and microarray analysis. **Plant Mol Biol**, 52, p. 371–386. 2003.

CASU, R.E.; MANNERS, J. M.; BONNETT, G. D.; JACKSON, P. A.; MCINTYRE, C. L.; DUNNE, R.; CHAPMAN, S. C.; RAE, A. L.; GROF, C. P. L. Genomics approaches for the identification of genes determining important traits in sugarcane. **Field Crops Res** 92, p. 137–147. 2005.

CERVERA, M.T.; RUIZ-GARCIA L.; MARTINEZ-ZAPATER, J.M. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylationsensitive AFLP markers. **Mol Genet Genom**; 268(4), p. 543–52, 2002.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. Breeding of sugarcane. 1st ed. Brasília: Embrapa **Technological Information**, p. 307. 2004.

CHAD, E. N.; ROBERT, J. S. Covering your bases: inheritance of DNA methylation in plant genomes. **Mol Plant**. 7 (3), p. 472-480. 2013. Disponível em: <10.1093/mp/sst165>.

CHAN, S. W. L.; HENDERSON, I. R.; JACOBSEN, S.E. Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. **Genetics** 6, p. 351–360. 2005.

CHANDRAN, D.; SHAROPOVA, N.; IVASHUTA, S.; GANTT, J. S.; VANDENBOSCH, K. A.; SAMAC, D. A. Transcriptome profiling identified novel genes associated with aluminum toxicity, resistance and tolerance in *Medicago truncatula*. **Planta** 228, p. 151–166. 2008.

CHANG, W. C.; LEE, T. Y.; HUANG, H. D.; HUANG, H. Y.; PAN, R. L. PlantPAN: plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial *cis*-regulatory elements with distance constraint in plant gene groups. **BMC Genomics** 9, p. 561–574. 2008.

CHARRON, C.; NICOLAÏ, M.; GALLOIS, J. L.; ROBAGLIA, C.; MOURY, B.; PALLOIX, A.; CARANTA, C. Natural variation and function analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg. **Plant J.** 54, p.56–68. 2008. Disponível em: < 10.1111/j.1365-313X.2008.03407.x>.

CHATENET, M.; MAZARIN, C.; GIRARD, J. C.; FERNADEZ, E.; GARGANI, D.; RAO, G. P.; ROYER, M.; LOCKHART, B. E. L.; ROTT, P. Detection of Sugarcane streak mosaic virus in sugarcane from several Asian countries. In: [ISSCT CONGRESS, 25], Jakarta. **Proceedings...** [Quatre-Bornes: ISSCT], v. 25, p. 656-662. 2005.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; ABREU, H. M. C.; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J. C.; BURNQUIST, W. L.; CRESTE, S.; DI CIERO, L.; FERRO, J. A.; FIGUEIRA, A. V. O.; FILQUEIRAS, T. S.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; GUZZO, E. C.; HOFFMANN, H. P.; LANDELL, M. G. A.; MATSUOKA, N. M.; REINACH, F. C.; ROMANO, E.; SILVA, W. J.; SILVA FILHO, M. C.; ULIAN, E. C. Sugarcane (*Saccharum x Officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Trop Plant Biol.** 4, p. 62–89. 2011.

CHEN, L.; ZHANG, L.; LI, D.; WANG, F.; YU, D. WRKY8 transcription factor functions in the TMV-cg defense response by mediating both abscisic acid and ethylene signaling in *Arabidopsis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 110, E1963–E1971. 2013. Disponível em: < 10.1073/pnas.1221347110>.

CHOI, C.S.; SANO, H. Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase- like protein in tobacco plants. **Mol Genet Genomics**; 277(5), p. 589–600, 2007.

CICATELLI, A.; TODESCHINI, V.; LINGUA, G.; BIONDI, S.; TORRIGIANI, P.; CASTIGLIONE, S. Epigenetic control of heavy metal stress response in mycorrhizal versus non-mycorrhizal poplar plants. **Environmental Science and Pollution Research**, 21, p. 1723–1737. 2014.

CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, safra 2015/2016, quarto levantamento**. Brasília, DF, 2016. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15\\_12\\_17\\_09\\_03\\_29\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_3o\\_lev\\_-\\_15-16.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_12_17_09_03_29_boletim_cana_portugues_-_3o_lev_-_15-16.pdf)>. Acesso em: 02 fev. 2017.

COSSON, P.; SCHURDI-LEVRAUD, V.; LE,Q.H.; SICARD, O.; CABALLERO, M.; ROUX, F.; LE GALL, O.; CANDRESSE, T.; REVERS, F. The RTM resistance to potyviruses in *Arabidopsis thaliana*: natural variation of the RTM genes and evidence for the implication of additional genes. **PLoS ONE** 7:e39169. 2012. Disponível em: <10.1371/journal.pone.0039169>.

COTTON, S.; GRANGEON, R.; THIVIERGE, K.; MATHIEU, I.; IDE, C.; WEI, T.; WANG, A.; LALIBERTE, J. F. *Turnip mosaic virus* RNA replication complex vesicles are mobile, align with microfilaments, and are each derived from a single viral genome. **J Virol** 83, p. 10460–10471. 2009.

CUBAS, P.; VINCENT, C; COEN, E. An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. **Nature** 401, p. 157–161. 1999.

CUI, X.; WEI, T.; CHOWDA-REDDY, R. V.; SUN, G.; WANG, A. The *Tobacco etch virus* P3 protein forms mobile inclusions via the early secretory pathway and traffics along actin microfilaments. **Virology**, 397, p. 56–63. 2010.

D'HONT, A.; RAO, P. S.; FELDMANN, P.; GRIVET, L.; ISLAM-FARIDI, N.; TAYLOR, P.; GLASZMANN, J. C. Identification and characterisation of intergeneric hybrids, *S. officinarum* x *Erianthus arundinaceus*, with molecular markers and in situ hybridization. **Theoretical and Applied Genetics** 91, p. 320-326. 1995.

D'HONT, A.; GRIVET, L.; FELDMANN, P.; GLASZMANN, J.C.; RAO, S.; BERDING, N. Characterization of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Mol Gen Genet**, 250, p. 405–413. 1996.

D'HONT, A.; ISON, D.; ALIX, K.; ROUX, C.; GLASZMANN, J. C. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. **Genome** 41, p. 221–225. 1998.

D'HONT, A.; GLASZMANN, J. C. Sugarcane genome analysis with molecular markers, a first decade of research. **Proc Int Soc Sugar Cane Technol** 24, p. 556–559. 2001.

D'HONT, A.; LU, Y. H.; FELDMANN, P.; GLASZMANN, J. C. Oligoclonal interspecific origin of 'North Indian' and 'Chinese' sugarcanes. **Chromosome Res** 10, p. 253–262. 2002.

DAL-BIANCO, M.; CARNEIRO, M. S.; HOTTA, C. T.; CHAPOLA, R. G.; HOFFMANN, H. P.; GARCIA, A.A.; SOUZA, G. M. Sugarcane improvement: how far can we go? **Curr. Opin. Biotechnol.** 23, p. 1–6. 2011.

DANGL, J. L.; HORVATH, D. M.; STASKAWICZ, B. J. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. **Science** 341(6147), p. 746–51. 2013.

DANIELS, J.; SMITH, P.; PATON, N.; WILLIAMS, C. A. The origin of the genus *Saccharum*. **Sugarcane Breeding Newsletter** 36, p. 24-39. 1975.

DANIELS, J.; ROACH, B. T. Taxonomy and evolution in sugarcane. In: HEINZ, D. J. (ED). **Sugarcane improvement through breeding**. Elsevier Press, Amsterdam, p. 7–84. 1987.

DAUGROIS, J.; ROQUES, D.; HOARAU, J. Y., LOMBARD, H.; GLASZMANN, J. C.; D'HONT, A. A putative major gene for rust resistance linked with a RFLP marker in sugarcane cultivar 'R570'. **Theor. Appl. Genet.** 92, p. 1059-1064. 1996. Disponível em: <10.1007/BF00224049>.

DE ABREU-NETO, J. B.; TURCHETTO-ZOLET, A. C.; DE OLIVEIRA, L. F. V.; BODANESE ZANETTINI, M. H.; MARGIS-PINHEIRO, M. Heavy metal-associated isoprenylated plant protein (HIPP): characterization of a family of proteins exclusive to plants. **FEBS J.** 280, p. 1604–1616 10.1111/febs.12159. 2013.

DEATON, A. M.; BIRD, A. CpG island and the regulation of transcription. **Genes Dev.** 25, p. 1010-1022. 2011. Disponível em: <1010-1022.10.1101/gad.2037511>.

DE CHASSEY, B.; NAVRATIL, V.; TAFFOREAU, L.; HIET, M. S.; AUBLIN-GEX A.; AGAUGUE, S.; MEIFFREN, G.; PRADEZYNSKI, F.; FABIA, B. F.; CHANTIER, T.; LE BRETON, M.; PELLET, J.; DAVOUST, N.; MANGEOT, P. E.; CHABOUD, A.; PENIN, F.; JACOB, Y.; VIDALIN, P. O.; VIDAL, M.; ANDRÉ, P.; RABOURDIN-COMBEC, C.; LOTTEAU, V. Hepatitis C virus infection protein network. **Mol Syst Biol.**, 4:230. 2008. Disponível em: < 10.1038/msb.2008.66>.

DELERIS, A.; HALTER, T.; NAVARRO, L. DNA methylation and demethylation in plant immunity. **Annu Rev Phytopathol.**, 54, p. 579–603. 2016.

DEREN, C. W. Genetic base of U.S. Mainland sugarcane. **Crop Science** v.35, p. 1195-1199. 1995.

DE RONDE, D.; BUTTERBACH, P.; KORMELINK, R. Dominant resistance against plant viruses. **Front. Plant Sci.** 5:307. 2014. Disponível em: <10.3389/fpls.2014.00307>.

DIATCHENKO, L.; LAU, Y. F.; CAMPBELL, A. P.; CHENCHIK, A.; MOGADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAVA, N.; SVERDLOV, E. D.; SIEBERT, P. D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 93, no. 12, p. 6025–6030. 1996.

DIAZ-PENDON, J. A.; TRUNIGER, V.; NIETO, C.; GARCIA-MAS, J.; BENDAHMANE, A.; ARANDA, M. A. Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. **Mol. Plant Pathol.** 5, p. 223–233. 2004. Disponível em: <10.1111/J.1364-3703.2004.00223.X>.

DIAZ-VIVANCOS, P.; CLEMENTE-MORENO, M. J.; RUBIO, M.; OLMOS, E.; GARCÍA, J. A.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, P.; HERNÁNDEZ, J. A. Alteration in the chloroplastic metabolism leads to ROS accumulation in pea plants in response to *Plum pox virus*, **J. Exp. Bot.** 59 2147e2160. 2008.

DIETRICH, D.; HAMMES, U.; THOR, K.; SUTER-GROTEMEYER, M.; FLUKIGER, R.; SLUSARENKO, A. J.; WARD, J. M.; RENTSCH, D. AtPTR1, a plasma membrane peptide transporter expressed during seed germination and in vascular tissue of *Arabidopsis*. **The Plant Journal** 40, p. 488–499. 2004.

DINARI, A.; NIAZI, A.; AFSHARIFAR, A. R.; RAMEZANI, A. Identification of upregulated genes under cold stress in cold-tolerant chickpea using the cDNA-AFLP approach. **PLoS One**. 2013. Disponível em: <10.1371/journal.pone.0052757>.

DITT, R.F.; NESTER, E.W.; COMAI, L. Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. **Proc Natl Acad Sci USA** 98, p. 10954–10959, 2001.

DODDS, P.N.; RATHJEN, J.P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. **Nat. Rev. Genet.** 11, p. 539–548. 2010.

DOHERTY, C. J.; BUSKIRK, H. A. V.; MYERS, S. J.; THOMASHOW, M. F. Roles for *Arabidopsis* CAMTA Transcription Factors in Cold-Regulated Gene Expression and Freezing Tolerance. **Plant Cell**, 21(3), p. 972-984. 2009. Disponível em: <10.1105/tpc.108.063958>.

DOLJA, V. V., HALDEMAN, R., ROBERTSON, N. L., DOUGHERTY, W. G. & CARRINGTON, J. C. Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. **EMBO J** 13, p. 1482–1491. 1994.

DONALDSON, R. P.; LUSTER, D. G. Multiple forms of plant cytochromes P450. **Plant Physiol.** 96, p. 669–674. 1991.

DONG, S.; STAM, R.; CANO, L. M.; SONG, J.; SKLENAR, J.; YOSHIDA, K.; BOZKURT, T. O.; OLIVA, R.; LIU, Z.; TIAN, M.; WIN, J.; BANDIED, M. J.; JONES, A. M.; VAN DER HOORN, R. A.; KAMOUN, S. Effector specialization in a lineage of the Irish potato famine pathogen. **Science** 343(6170), p. 552–5. 2014.

DORNEZ, E.; CROES, E.; GEBRUERS, K.; DE CONINCK, B.; CAMMUE, B. P. A.; DELCOUR, J. A.; COURTIN, C. M. Accumulated evidence substantiates a role for three classes of wheat xylanase inhibitors in plant defense. **Crit Rev Plant Sci.** 29, p. 244–264. 2010. Disponível em: < 10.1080/07352689.2010.487780>.

DOS SANTOS, R. S.; KRÜGER, M. M.; PEGORARO, C.; MADABULA, E. P.; MAIA, L. C.; ROMBALDI, C. V.; OLIVEIRA, A. C. Transcriptional regulation of seven ERFs in rice under oxygen depletion and iron overload stress. **Tropical Plant Biol**, 6, p. 16–25. 2013. Disponível em: < 10.1007/s12042-013-9117-1>.

DOWN, T. A.; RAKYAN, V. K.; TURNER, D.J.; FLICEK, P.; LI, H.; KULESHA, E.; GRAF, S.; JOHNSON, N.; HERRERO, J.; TOMAZOU, E. M.; THORNE, N. P.; BACKDAHL, L.; HERBERTH, M.; HOWE, K. L.; JACKSON, D. K.; MIRETTI, M. M.; MARIONI, J. C.; BIRNEY, E.; HUBBARD, T. J.; DURBIN, R.; TAVARÉ, S.; BECK, S. A Bayesian deconvolution strategy for immunoprecipitation-based DNA methylome analysis. **Nat Biotechnol** 26, p. 779–785. 2008.

DUARTE FILHO, L.S.C.; SILVA, P. P.; SANTOS, J. M.; BARBOSA, G. V. S.; RAMALHO NETO, C. E.; SOARES, L.; ANDRADE, J. C. F.; ALMEIDA, C. Genetic similarity among genotypes of sugarcane estimated by SSR and coefficient of parentage. **Sugar Tech** 12, p. 145–149. 2010.

DURRANT, W.E.; ROWLAND, O.; PIEDRAS, P.; HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES J.D. cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. **Plant Cell** 12, p. 963–977, 2000.

DZIALO, M.; SZOPA, J.; CZUJ, T.; ZUK, M. Oligodeoxynucleotides can transiently up-and downregulate gene expression in Flax by changing DNA-Methylation in a Sequence-Specific Manner. **Front. Plant Sci.** 8, p. 755. 2017. Disponível em: <10.3389/fpls.2017.00755>.

EBADZAD, G.; CRAVADOR, A. Quantitative RT-PCR analysis of differentially expressed genes in *Quercus suber* in response to *Phytophthora cinnamomi* infection. **Springer Plus**, 3, p. 613. 2014. Disponível em: <10.1186/2193-1801-3-613>.

ELENA, S. F.; RODRIGO, G. Towards an integrated molecular model of plant-virus interactions. **Curr Opin Virol.** 2: 719-724. 10.1016/j.coviro.2012.09.004. 2012.

ENGLER, P.; WENG, A.; STORB, U. Influence of CpG methylation and target spacing on V(D)J recombination in a transgenic substrate. **Mol Cell Biol** 13(1), p. 571–7.1993.

FAOSTAT. Rome: Food and Agriculture Organization of the United States, 2013. Área colhida, produção mundial e produção nos principais países produtores de cana-de-açúcar. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 02 fev. 2017.

FEIL, R.; FRAGA, M.F. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. **Nature Reviews in Genetics** 13, p. 97–109. 2012.

FENG, S.; COKU, S. J.; ZHANG, X.; CHEN, P. Y.; BOSICK, M. G.; HETZEL, J.; JAIN, J.; STRAUSS, S. H.; HALPERN, M. E.; UKOMADU, C.; SADLER, K. C.; PRADHAN, S.; PELLEGRINI, M.; JACOBSEN, S. E. Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 107, 8689-8694. 2010. Disponível em: <10.1073/pnas.1002720107>.

FIELDES, M.A.; SCHAEFFER, S.M.; KRECH, M.J.; BROWN, J. C. DNA hypomethylation in 5-azacytidine-induced early-flowering lines of flax. **Theor Appl Genet**;111(1), p. 136–49, 2005.

FIELDES, M.A. Heritable effects of 5-azacytidine treatments on the growth and development of flax (*Linum usitatissimum*) genotrophs and genotypes. **Genome** ;37(1), p. 1–11. 1994.

FIGUEIRA, T. R. S.; SERRANO, G. C. M.; ARRUDA, P. Evolution of the genes encoding seed storage proteins in sugarcane and maize. **Trop Plant Biol.**, 1, p. 108–119. 2008.

FRAGA, M. E., ESTELLER, M. DNA methylation: a profile of methods and applications. *BioTechniques*, 33, p. 632–649. 2002.

FREELING, M.; LYONS, E.; PEDERSEN, B.; ALAM, M.; MING, R.; LISCH, D. Many or most genes in *Arabidopsis* transposed after the origin of the order *Brassicales*. **Genome Res.** 18(12), p. 1924–37. 2008.

FULNECEK, J.; KOVARIK, A. How to interpret Methylation Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) profiles? **BMC Genetics**, 15, p. 2–9. 2014.

GENT, J. I.; ELLIS, N. A.; GUO, L.; HARKESS, A. E.; YAO, Y.; ZHANG, X.; DAWE, R. K. CHH islands: de novo DNA methylation in near-gene chromatin regulation in maize. **Genome Res.** 23, p. 628–37. 2013.

GIBBS, A. J.; OHSHIMA, K.; PHILLIPS, M. J.; GIBBS, M. J. The prehistory of potyviruses: their initial radiation was during the dawn of agriculture. **PLoS ONE** 3, e2523. 2008.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiol. Biochem.** 48, p. 909–930. 2010. Disponível em: <10.1016/j.plaphy.2010.08.016>.

GÓMEZ-DÍAZ, E., JORDÀ, M., PEINADO, M.A. & RIVERO, A. Epigenetics of host–pathogen interactions: the road ahead and the road behind. **PLoS Pathog** 8, e1003007. 2012.

GONÇALVES, M. C.; PINTO, L. R.; SOUZA, S. C.; LANDELL, M. G. A. Virus Diseases of Sugarcane. A Constant Challenge to Sugarcane Breeding in Brazil. **Functional Plant Science & Biotechnology** 6, p. 108-116. 2012.

GONÇALVES, M. C.; SANTOS, A. S.; MAIA, L. G.; CHAGAS, C. M.; HAKAKAVA, R. Caracterização de um isolado do *Sugarcane mosaic virus* que quebra a resistência de variedades comerciais de cana-de-açúcar. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, n. 1, p. 32-39, 2007.

GONÇALVES, M.C.; MOREIRA, Y. J. C. B.; MAIA, I. G.; SANTOS, A. S.; FANTIN, G. M.; CHAVES, A. Identificação e caracterização de isolados pertencentes ao subgrupo do Sugarcane mosaic virus no estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, 29, p. 129-129, 2004.

GRABHERR, M. G.; HAAS, B. J.; YASSOUR, M.; LEVIN, J. Z.; THOMPSON, D. A.; AMIT, I.; ADICONIS, X.; FAN, L.; RAYCHOWDHURY, R.; ZENG, Q.; CHEN, Z.; MAUCELI, E.; HACOEN, N.; GNIRKE, A.; RHIND, N.; DI PALMA, F.; BIRREN, B. W.; NUSBAUM, C.; LINDBLAD-TOH, K.; FRIEDMAN, N.; REGEV, A. Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. **Nat. Biotechnol.** 29, p. 644–652. 2011.

GRANGEON, R., JIANG, J., WAN, J., AGBECI, M., ZHENG, H. & LALIBERTE´, J. F. 6K2-induced vesicles can move cell to cell during turnip mosaic virus infection. **Front Microbiol** 4, 351. 2013.

GRATIVOL, C.; REGULSKI, M.; BERTALAN, M.; MCCOMBIE, W. R.; DA SILVA, F. R.; ZERLOTINI, N. A.; VICENTINI, R.; FARINELLI, L.; HEMERLY, A. S.; MARTIENSSEN, R. A.; FERREIRA, P. C. Sugarcane genome sequencing by methylation filtration provides tools for genomic research in the genus *Saccharum*. **Plant J** 79, p. 162-172. 2014.

GREAVES I. K; GROSZMANN, M.; YING, H.; TAYLOR, J. M.; PEACOCK, W. J.; DENNIS, E. S. Trans chromosomal methylation in Arabidopsis hybrids. **Proc Natl Acad Sci USA** 109(9), p. 3570–3575. 2012.

GRECO, M.; CHIAPPETTA, A.; BRUNO, L.; BITONTI, M. B. In *Posidonia oceanica* cadmium induces changes in DNA methylation and chromatin patterning. **Journal of Experimental Botany**, 63, p. 695–709. 2012.

GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current Opinion in Plant Biology** 5, p. 122-127. 2002.

GRIVET, L.; DANIELS, C.; GLASZMANN, J. C.; D'HONT, A. A review of recent molecular genetics evidence for sugarcane evolution and domestication. **Ethnobotany Research and Application**, Honolulu, v. 2, p. 9–17, 2004.

GUIMARÃES, C. T. ;HONEYCUTT,R. J. ;SILLS,G. R.;SOBRAL,B. W. S. Genetic maps of *Saccharumofficinarum* L. and *Saccharumrobustum*. **Genet.Mol.Biol.**, 22, p. 125–132. 1999. Disponível em: <10.1590/S1415-47571999000100024>.

GUIMARÃES, C. T.; SILLS, G. R.; SOBRAL, B. W. S. Comparative mapping of Andropogoneae: *Saccharum* L. (sugarcane) and its relation to sorghum and maize. *Proc Natl Acad Sci.*, 94, p.14261–14266. 1997.

GUO, H. M.; LI Z. C.; ZHOU M. L.; CHENG H. M. cDNA-AFLP analysis reveals heat shock proteins play important roles in mediating cold, heat, and drought tolerance in *Ammopiptanthus mongolicus*. **Funct Integr Genomics** 14(1), p. 127–133. 2014.

GUSBERTI, M.; GESSLER, C.; BROGGINI, G. A. RNA-Seq Analysis Reveals Candidate Genes for Ontogenic Resistance in *Malus-Venturia* Pathosystem. **PLoS One** 8: e78457. 2013.

HA, S.; MOORE, P.H.; HEINZ, D.; KATO, S.; OHMIDO, N.; FUKUI, K. Quantitative chromosome map of the polyploid *Saccharum spontaneum* by multicolor fluorescence in situ hybridization and imaging methods. **Plant Mol Biol**, 39, p. 1165–1173. 1999.

HAO, W., COLLIER, S. M., MOFFETT, P.; CHAI, J. Structural basis for the interaction between the potato virus X resistance protein (Rx) and its cofactor Ran GTPase-activating protein 2 (RanGAP2). **J. Biol. Chem.** 288, p. 35868–35876. 2013. Disponível em: <10.1074/jbc.M113.517417>.

HARRISON, A.; PARLE-MCDERMOTT, A. DNA methylation: a timeline of methods and applications. **Front Genet.** v. 2 p. 1-13. 2011.

HASHIDA, S. N.; UCHIYAMA, T.; MARTIN, C.; KISHIMA, Y.; SANO, Y.; MIKAMI, T. The temperature-dependent change in methylation of the *Antirrhinum* transposon Tam3 is controlled by the activity of its transposase. **Plant Cell.** 18, p. 104–118. 2006.

HAYASHIZAKI, Y.; SHIBATA, H.; HIROTSUNE, S.; SUGINO, H.; OKAZAKI, Y.; SASAKI, N.; HIROSE, K.; IMOTO, H.; OKUIZUMI, H.; MURAMATSU, M.; KOMATSUBARA, H.; SHIROISHI, T.; MORIWAKI, K.; KATSUKI, M.; HATANO, N.; SASAKI, H.; UEDA, T.; MISE, N.; TAKAGI, N.; PLASS, C.; CHAPMAN, V. M. Identification of an imprinted U2af binding protein-related sequence on mouse chromosome using the RLGS method. **Nat Genet** 6, p. 33–40, 1994.

HÄMÄLÄINEN, J.H., KEKARAINEN, T., GEBHARDT, C., WATANABE, K. N.; VALKONEN, J. P. Recessive and dominant genes interfere with the vascular transport of potato virus A in diploid potatoes. **Mol. Plant Microbe Interact.** 13, p. 402–412. 2000. Disponível em: <10.1094/MPMI.2000.13.4.402>.

HE, F.; TAKASHI, U.; SAITO, K.; TAKUSHI, H.; WATANABE, S.; YABUKI, T.; KIGAWA, T.; TAKAHASHI, M.; KUWASAKO, K.; TSUDA, K.; MATSUDA, T.; AOKI, M.; SEKI, E.; KOBAYASHI, N.; GÜNTERT, P.; YOKOYAMA, S.; MUTTO, Y. Structural insight into the Zinc Finger CW domain as a histone modification reader. **Structure**, 8;18(9), p. 1127–1139. 2010. Disponível em: <10.1016/j.str.2010.06.012>.

HERMAN, J.G.; GRAFF, J.R.; MYOHANEN, S.; NELKIN, B.D.; BAYLIN, S.B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proc Natl Acad Sci USA** 93, p. 9821–9826. 1996.

HERRERA, C. M.; BAZAGA, P. Untangling individual variation in natural populations: ecological, genetic and epigenetic correlates of long-term inequality in herbivory. **Molecular Ecology**, 20, p. 1675–1688. 2011.

HERRERA, C. M., BAZAGA P. Epigenetic differentiation and relationship to adaptive genetic divergence in discrete populations of the violet *Viola cazorlensis*. **New Phytologist**, 187, p. 867–876. 2010.

HOLESKI, L.M.; JANDER, G.; AGRAWAL, A.A. Transgenerational defense induction and epigenetic inheritance in plants. **Trends Ecol Evol**, 2012.

HONG, Y.; HUNT, A. G. RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase. **Virology** 226, p.146–151. 1996.

HOTTA, C. T.; LEMBKE, C. G.; DOMINGUES, D. S.; OCHOA, E. A.; CRUZ, M. Q.; MELOTTO-PASSARIN, D. M.; MARCONI, T. G.; SANTOS, M. O.; MOLLINARI, M.; MARGARIDO, R. A.; CRIVELLARI, A. C.; SANTOS, W. D.; AMANDA, P.; HOSHINO, A. A.; CARRER, H.; ANETE, P.; GARCIA, A.F.; BUCKERIDGE, M. S.; MENOSSI, M.; VAN SLUYS, M.A.; GLAUCIA, M. The biotechnology roadmap for sugarcane improvement. **Trop Plant Biol** 3, p. 75–87. 2010.

HUA, Z.; ZOU, C.; SHIU, S. H.; VIERSTRA, R. D. Phylogenetic comparison of F-Box (FBX) gene superfamily within the plant kingdom reveals divergent evolutionary histories indicative of genomic drift. **PLoS ONE** 6:e16219. 2011.

HUANG, T.H.; LAUX, D.E.; HAMLIN, B.C.; TRAN, P.; TRAN, H.; LUBAHN, D.B. Identification of DNA methylation markers for human breast carcinomas using the methylation-sensitive restriction fingerprinting technique. **Cancer Res** 57, p. 1030–1034, 1997.

HUANG, T.H.; PERRY, M.R.; LAUX, D.E. Methylation profiling of CpG islands in human breast cancer cells. **Hum Mol Genet** 8, p. 459–470, 1999.

HUBANK, M.; SCHATZ, D. G. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. **Nucleic Acids Research**, vol. 22, no. 25, p. 5640–5648. 1994.

IRVINE, J. E. *Saccharum* species as horticultural classes. **Theor Appl Genet** 98, p. 186–194. 1999.

IVANOV, K. I.; ESKELIN, K.; LÖHMUS, A.; MÄKINEN, K. Molecular and cellular mechanisms underlying potyvirus infection. **J. Gen. Virol.** 10.1099/vir.0.064220-0. 10 April 2014.

IWASAKI, M.; PASZKOWSKI, J. Identification of genes preventing transgenerational transmission of stress-induced epigenetic states. **Proc Natl Acad Sci U S A** 111, p. 8547–52. 2014.

JALMI S. K., SINHA A. K. Functional involvement of a mitogen activated protein kinase module, OsMKK3-OsMPK7-OsWRK30 in mediating resistance against *Xanthomonas oryzae* in rice. **Scientific Reports** 6: 37974. 2016.

JIA, F.; WU, B.; LI, H.; HUANG, J.; ZHENG, C. Genome-wide identification and characterisation of F-box family in maize. **Mol Genet Genomics** 288, p. 559–577. 2013.

JING, Y.; LIN, R. The VQ Motif-Containing Protein Family of Plant-Specific Transcriptional Regulators. *Plant Physiol.*, 169(1), p. 371–378. 2015. Disponível em: <10.1104/pp.15.00788>.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature** 444, p. 323–329. 2006.

JOSHI, R. K.; NAYAK S. Perspectives of genomic diversification and molecular recombination towards R-gene evolution in plants. **Physiol Mol Biol Plants** 19(1), p. 1–9. 2013.

JULIO, E.; COTUCHEAU, J.; DECORPS, C.; VOLPATTI, R.; SENTENAC, C.; CANDRESSE, T.; DE BORNE, F. D. A eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) is responsible for the “va” tobacco recessive resistance to potyviruses. **Plant Mol. Biol. Rep.**, v. 33, p. 609-623. 2014. Disponível em: < 10.1007/s11105-014-0775-4>.

KADER, M. A.; LINDBERG, S. Cytosolic calcium and pH signaling in plants under salinity stress. **Plant Signal Behav** 5, p.233–238. 2010.

KANKEL, M. W.; RAMSEY, D. E.; STOKES, T. L.; FLOWERS, S. K.; HAAG, J. R.; JEDDELOH, J. A.; RIDDLE, N. C.; VERBSKY, M. L.; RICHARDS, E. J. Arabidopsis MET1 cytosine methyltransferase mutants. *Genetics* 163, p. 1109–1122. 2003.

KARLSSON M, WEBER W, FUSSENEGGER M. *De novo* design and construction of an inducible gene expression system in mammalian cells. **Methods Enzymol** 497, p. 239–253. 2011.

KASCHANI, F., SHABAB, M., BOZKURT, T., SHINDO, T., SCHORNACK, S., GU C.; ILYAS, M.; WIN, J.; KAMOUN, S.; VAN DER HOORN, R. A. An effector-targeted protease contributes to defense against *Phytophthora infestans* and is under diversifying selection in natural hosts. **Plant Physiol.** 154(4), p. 1794–804. 2010.

KAUR, J.; SEBASTIAN, J.; SIDDIQI, I. The *Arabidopsis*-mei2-like genes play a role in meiosis and vegetative growth in *Arabidopsis*. **Plant Cell.** 18, p. 545–559. 2006.

KEYTE, A.L.; PERCIFIELD, R.; LIU, B.; WENDEL, J. F. Intraspecific DNA methylation polymorphism in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **J Hered**; 97(5), p. 444–50. 2006.

KNIGHT, H.; KNIGHT, M. R. Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk. **TrendsPlantSci.**, 6, p. 262–267. 2001. Disponível em: <10.1016/S1360-1385(01)01946-X>.

KOIKE, H.; GILLASPIE, A. G. Mosaic. In: RICAUD, C.; EGAN, B. T.; GILLASPIE, A. G.; HUGHES, C. G. (EDS). **Diseases of Sugarcane—Major Diseases**. Science Publishers, Amsterdam, p. 301-322. 1989.

KOVALCHUK, I.; KOVALCHUK, O.; KALCK, V.; BOYKO, V.; FILKOWSKI, J.; HEINLEIN, M.; HOHN, B. Pathogen-induced systemic plant signal triggers DNA rearrangements. **Nature** 423(6941), p. 760–2. 2003.

KUDLA, J.; XU, Q.; HARTER, K.; GRUISSEM, W.; LUAN, S. Genes for calcineurin B-like proteins in Arabidopsis are differentially regulated by stress signals. **Proc Natl Acad Sci U S A** 96, p. 4718–4723. 1999.

KURODA, H.; TAKAHASHI, N.; SHIMADA, H.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; MATSUI, M. Classification and expression analysis of Arabidopsis F-boxcontaining protein genes. **Plant Cell Physiol** 43, p. 1073–1085. 2002.

LAIRD, P.W. Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis. **Nature Reviews Genetics**, 11, p. 191–203. 2010.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; AITKEN, K. S.; GROF, C. L. P.; BONNETT, G. D.; SMITH, G. R. Invited review: Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunitis. **In Vitro Cell Developmental Biology Plant**, v.41, p. 345-63, 2005.

LAMMERINK, J.; MACGIBBON, D. B.; WALLACE, A. R. Effect of the cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*) on total glucosinolate in the seed of oilseed rape (*Brassica napus*). **N. Z. J. Agr. Res.** 27, p. 89–92, 1984.

LANDELL, M. G. de A.; BRESSIANI, J. A. Melhoramento genético, caracterização e manejo varietal. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: IAC 2008. Cap. 5, p. 101-127, 149.

LAW, J. A., JACOBSEN S. E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. **Nat Rev Genet.** 11, p. 204–20. 2010.

LECHNER, E.; ACHARD, P.; VANSIRI, A.; POTUSCHAK, T.; GENSHIK, P. F-box proteins everywhere. **Curr Opin Plant Biol** 9, p. 631–638. 2006.

LE CUNFF, L.; GARSMEUR, O.; RABOIN, L. M.; PAUQUET, J.; TELISMART, H.; SELVI, A.; GRIVET, L.; PHILIPPE, R.; BEGUM, D.; DEU, M.; COSTE, L.; WING, R.; GLASZMANN, J. C.; D'HONT, A. Diploid/polyploid syntenic shuttle mapping and haplotype-specific chromosome walking toward a rust resistance gene (Bru1) in highly polyploid sugarcane (2n approximately 12x approximately 115). **Genetics**, 180, p. 649–60. 2008.

LEI, C. P.; JIUN, K. S.; CHOO, C. S.; SINGH, R. Analysis of tissue culture-derived regenerants using methylation sensitive AFLP. **As. Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.**, v.14 (2), p. 47-55. 2006.

LEWIS, J. D.; LAZAROWITZ, S. G. Arabidopsis synaptotagmin SYTA regulates endocytosis and virus movement protein cell-to-cell transport. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 107, p. 2491–2496. 2010.

LI, X. H.; VALDEZ, P.; OLVERA, R. E.; CARRINGTON, J. C. Functions of the tobacco etch virus RNA polymerase (NIb): subcellular transport and protein–protein interaction with VPg/proteinase (NIa). **J Virol** 71, p.1598–1607. 1997.

LI, Q.; WANG, X.; SUN, H.; ZENG, J.; CAO, Z.; LI, Y.; QIAN, W. Regulation of Active DNA Demethylation by a Methyl-CpG-Binding Domain Protein in *Arabidopsis thaliana*. **Plos Genet.** 1;11(5):e1005210. 2015. Disponível em: <10.1371/journal.pgen.1005210>.

LICAUSI, F.; OHME-TAKAGI, M.; PERATA, P. APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF) transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs. *New Phytol.*, 199, p. 639–649 .2013. Disponível em: < 10.1111/nph.12291>.

LIRA-MEDEIROS, C. F.; PARISOD, C.; FERNANDES, R. A.; MATA, C. S.; CARDOSO, M. A.; FERREIRA, P. C. G. Epigenetic variation in mangrove plants occurring in contrasting natural environment. **PLoS ONE**, 5, e10326. 2010.

LOVE, A. J.; LAVAL, V.; GERI, C.; LAIRD, J.; TOMOS, A.D.; HOOKS, M. A.; MILNER, J. J. Components of Arabidopsis defense- and ethylene-signaling pathways regulate susceptibility to cauliflower mosaic virus by restricting long-distance movement. **Mol. Plant Microbe Interact.** 20, p. 659–670. 2007. Disponível em: <10.1094/MPMI-20-6-0659>.

MA, H.M.; SCHULZE, S.; LEE, S.; YANG, M.; MIRKOV, E.; IRVINE, J.; MOORE, PATERSON A. An EST survey of the sugarcane transcriptome. **Theor Appl Genet** 108, p. 851–863. 2004.

MANNERS, J. M.; CASU R. E. Transcriptome analysis and functional genomics of sugarcane. **Trop Plant Biol**, 4, p. 9-21. 2011.

MARCONI, G.; PACE, R.; TRAINI, A.; RAGGI, L.; LUTTS, S.; CHIUSANO, M.; GUIDUCCI, M.; FALCINELLI, M.; BENINCASA, P.; ALBERTINI, E. Use of MSAP Markers to Analyse the Effects of Salt Stress on DNA Methylation in Rapeseed (*Brassica napus* var. *oleifera*). **PLoS ONE** 8(9): e75597. pmid:24086583. 2013.

MARTÍNEZ, F.; RODRIGO, G.; ARAGONÉS, V.; RUIZ, M; RODRIGO, G.; ARAGONÉS, V.; RUIZ, M.; LODEWIJK, I.; FERNÁNDEZ, U.; ELENA, S., F.; DARÒS, J., A. Interaction network of tobacco etch potyvirus NIa protein with the host proteome during infection. **BMC Genomics** 17, 87. 2016. Disponível em: <10.1186/s12864-016-2394-y>.

MATZKE, M. A.; MOSHER, R. A. RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. **Nature Rev. Genet.** 15, p. 394–408, 2014.

MAUNAKEA, A. K.; NAGARAJAN, R. P.; BILENKY, M.; BALLINGER, T. J.; D'SOUZA, S.; FOUSE, S. D.; JOHNSON, B. E.; HONG, C.; NIELSEN, C.; ZHAO, Y.; TURECKI, G.; DELANEY, A.; VARHOL, R.; THIESSEN, N.; SHCHORS, K.; HEINE, V. M.; ROWITCH, D. H.; XING, X.; FIORE, C.; SCHILLEBEECKX, M.; JONES, S. J. M.; HAUSSLER, D.; MARRA, M. A.; HIRST, M.; WANG, T.; COSTELLO, J. F. Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. **Nature** 466(7303), p. 253–257. 2010.

MCGREW, M.J.; ROSENTHAL, N. Quantitation of genomic methylation using ligation-mediated PCR. **Biotechniques** 15, p. 722–729, 1993.

MEDEIROS, C. N. F.; GONCALVES, M. C.; HARAKAVA, R.; CRESTE, S.; NOBILE, P. M.; PINTO, L. R.; PERECIN, D.; LANDELL, M. G. A. Sugarcane transcript profiling assessed by cDNA-AFLP analysis during the interaction with *Sugarcane mosaic virus*. **Adv Microbiol** 4, p. 511–520. 2014.

MEDRANO, M.; HERRERA, C. M.; BAZAGA, P. Epigenetic variation predicts regional and local intraspecific functional diversity in a perennial herb. **Molecular Ecology**, 23, p. 4926–4938. 2014.

MEDVEDEVA, Y.A.; KHAMIS, A.M.; KULAKOVSKIY, I.V.; BA-ALAWI, W.; BHUYAN, M.S.; KAWAJI, H.; LASSMANN, T.; HARBERS, M.; FORREST, A.R.; BAJIC, V.B.; CONSORTIUM, F. Effects of cytosine methylation on transcription factor binding sites. **BMC Genomics** 15(1):119, 2014

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C.A., Jr. Innate immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition. **Cell** 91, p. 295–298. 1997.

MELOTTO, M.; UNDERWOOD, W.; KOCZAN, J.; NOMURA, K.; HE, S. Y. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. **Cell** 126, p.969–980. 2006. Disponível em: <10.1016/j.cell.2006.06.054>.

MERITS, A.; GUO, D.; JARVEKU, L. G., L.; SAARMA, M. Biochemical and genetic evidence for interactions between *potato A potyvirus* encoded proteins P1 and P3 and proteins of the putative replication complex. **Virology** 263, p.15–22. 1999.

MERITS, A.; RAJAMA, K.I, M. L.; LINDHOLM, P.; RONEBERG-ROOS, P.; KEKARAINEN, T.; PUUSTINEN, P.; MA KELAINEN, K.; VALKONEN, J. P. ; SAARMA, M. Proteolytic processing of potyviral proteins and polyprotein processing intermediates in insect and plant cells. **J Gen Virol** 83, p.1211–1221. 2002.

MEYERS, B. C. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. **Plant Cell**. 15(4), p. 809–34. 2003.

MING, R.; LIU, S-C; LIN, Y-R; DA SILVA, J.; WILSON, W.; BRAGA, D.; VAN DEYNZE, A.; WENSLAFF, T. F.; WU, K. K.; MOORE, P. H.; BURNQUIST, W.; SORRELLS, M. E.; IRVINE, J. E.; PATERSON, A. H. Detailed alignment of *Saccharum* and *Sorghum* Chromosomes: Comparative organisation of closely related diploid and polyploidy genomes. **Genetics** 150, p. 1663–1682. 1998.

MIROUZE, M.; PASZKOWSKI, J. Epigenetic contribution to stress adaptation in plants. **Curr Opin Plant Biol.** 14, p. 267–74. 2011.

MOFFETT, P. Mechanisms of recognition in dominant R gene mediated resistance. **Adv. Virus Res.** 75, p. 1–33. 2009. Disponível em: <10.1016/S0065-3527(09)07501-0>.

MOGHADAM, P. K.; JACKSON, M. B. The functional significance of synaptotagmin diversity in neuroendocrine secretion. **Front. Endocrinol.** 4:124. 2013.

MOHR, P. G.; CAHILL, D. M. Abscisic acid influences the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae* pv. Tomato and *Peronospora parasitica*. **Funct.PlantBiol** 30, p. 461–469. 2003. Disponível em:< 10.1071/FP02231>.

MONAGHAN, J.; ZIPFEL, C. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. **Curr Opin Plant Biol.** 15(4), p. 349–57. 2012.

MORAIS, L. K.; AGUIAR, M., S.; ALBUQUERQUE E SILVA, P.; CÂMARA, T., M., M.; CURSI, D., E.; FERNANDES JÚNIOR, A., R.; CHAPOLA, R., G.; CARNEIRO, M., S.; BESPALHOK FILHO, J.,C. Breeding of Sugacane. In: CRUZ, V., M., V.; DIERIG, D., A. (EDS). **Industrial Crops: Breeding for BioEnergy and Bioproducts**. Springer, p. 29-42. 2015.

MORALES-RUIZ T, ORTEGA-GALISTEO AP, PONFERRADA-MARIN MI, MARTINEZ- MACIAS MI, ARIZA RR, ROLDAN-ARJONA T. DEMETER and REPRESSOR OF SILENCING 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases. **Proc Natl Acad Sci USA** 103, p. 6853–6858. 2006.

MUKHERJEE, S. K. Origin and distribution of *Saccharum*. **Botanical Gazette** 19, p. 55- 61. 1957.

MULLER, K.; DOUBNEROVA, V.; SYNKOVA, H.; CEROVSKA, N.; RYSLAVA, H. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in PVYNTN-infected tobacco plants, **Biol. Chem.** 390, p. 245–251. 2009.

NARUSAKA, Y.; NARUSAKA, M.; SEKI, M.; UMEZAWA, T.; ISHIDA, J.; NAKAJIMA, M.; ENJU, A.; SHINOZAKI, K. Crosstalk in the responses to abiotic and biotic stresses in Arabidopsis: analysis of gene expression in cytochrome P450 gene superfamily by cDNA microarray. **Plant Mol. Biol.** 55, p. 327–342. 2004.

NICAISE, V. Crop immunity against viruses: outcomes and future challenges. **Front. Plant Sci.** 5, 660. 2014.

NICAISE, V.; CANDRESSE, T. *Plum pox virus* capsid protein suppresses plant pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity. **Mol Plant Pathol**, 18 p. 878–886. 2017.

NICAISE, V.; GERMAN-RETANA, S.; SANJUÁN, R.; DUBRANA, M.; MAZIER, M.; MAISONNEUVE, B.; CANDRESSE, T.; CARANTA, C.; LEGALL, O. The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus lettuce mosaic virus. **Plant Physiol.** 132, p. 1272–1282. 2003. Disponível em: <10.1104/pp.102.017855.1>.

NISHIYAMA, M. Y. Jr; VICENTE, F. F. R.; LEMBKE, C. G.; SATO, P. M.; DAL-BIANCO, M. L.; FANDIN O, R. A.; HOTTA, C. T.; SOUZA, G. M. The SUCEST-FUN regulatory network database: designing and energy grass. **International Society of Sugarcane Technologists.** 2010.

NURNBERGER, T.; BRUNNER, F. Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. **Curr. Opin. Plant Biol.** 5, p. 318–324. 2002.

NURUZZAMAN, M.; SHARONI, A. M.; KIKUCHI, S. Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. **Front Microbiol.**, 3;4:248. 2013. Disponível em: <10.3389/fmicb.2013.00248>.

O'LEARY, B.; PARK, J.; PLAXTON, W.C. The remarkable diversity of plant PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase): Recent insights into the physiological functions and post-translational controls of nonphotosynthetic PEPCs. **Biochem J.** 436, p. 15–34. 2011.

OKA, K.; KOBAYASHI, M.; MITSUHARA, I.; SEO, S. Jasmonic acid negatively regulates resistance to tobacco mosaicvirus in tobacco. **Plant Cell Physiol.** 54, p. 1999–2010. 2013. Disponível em: <10.1093/pcp/pct137>.

OKURA, V. K.; DE SOUZA, R. S.; DE SIQUEIRA TADA, S. F.; ARRUDA, P. BAC-Pool Sequencing and Assembly of 19 Mb of the Complex Sugarcane Genome. **Frontiers in plant science** 7, p. 342. 2016. Disponível em: <10.3389/fpls.2016.00342>.

OLIVEIRA, K. M.; PINTO, L. R.; MARCONI, T. G.; MARGARIDO, G. R. A.; PASTINA, M. M.; TEIXEIRA, L. H. M.; FIGUEIRA, A. V.; ULIAN, E. C.; GARCIA, A. A. F.; SOUZA, A. P. Functional integrated genetic linkage map based on EST-markers for a sugarcane (*Saccharum* spp.) commercial cross. **Mol Breed** 20, p.189–208. 2007. Disponível em: < 10.1007/s11032-007-9082-1>.

OUIBRAHIM, L., MAZIER, M., ESTEVAN, J., PAGNY, G., DECROOCQ, V., DESBIEZ, C.; MORETTI, A.; GALLOIS, J. L.; CARANTA, C. Cloning of the Arabidopsis rwm1 gene for resistance to watermelon mosaic virus points to a new function for natural virus resistance genes. **Plant J.** 79, p. 705–716. 2014. Disponível em: <10.1111/tpj.12586>.

PALHARES, A.C.; RODRIGUES-MORAIS, T. B.; VAN SLUYS, M. A.; DOMINGUES, D. S.; MACCHERONI, W.; JORDÃO, H.; SOUZA, A. P.; MARCONI, T. G.; MOLLINARI, M.; GAZAFFI, R.; GARCIA, A. A. F.; CARNEIRO VIEIRA, M. L. A novel linkage map of sugarcane with evidence for clustering of retrotransposon-based markers. **BMC Genet** 13:51. 2012. Disponível em: < 10.1186/1471-2156-13-51>.

PANDEY, P.; RAMEGOWDA, V.; SENTHIL-KUMAR, M. Shared and unique responses of plants to multiple individual stresses and stress combinations: physiological and molecular mechanisms. **Front. Plant Sci.** 6:723. 2015. Disponível em: <10.3389/fpls.2015.00723>.

PAPA, C. M.; SPRINGER, N. M.; MUSZYNSKI, M. G.; MEELEY, R.; KAEPLER, S. M. Maize chromomethylase *Zea methyltransferase2* is required for CpNpG methylation. **Plant Cell**, 13, p. 1919–1928. 2001.

PAPINI-TERZI, F. S.; ROCHA, F. R.; VENCIO, R. Z.; OLIVEIRA, K. C.; FELIX, J. de M.; VICENTINI, R.; ROCHA, C. de S.; SIMOES, A. C.; ULIAN, E. C.; DI MAURO, S. M.; DA SILVA, A. M.; PEREIRA, C. A.; MENOSSI, M.; SOUZA, G. M. Transcription profiling of signal transduction-related genes in sugarcane tissues. **DNA Res** 12, p. 27-38. 2005.

PAPINI-TERZI, F. S.; ROCHA, F. R.; VENCIO, R. Z.; FELIX, J. M.; BRANCO, D. S.; WACLAWOVSKY, A. J.; DEL BEM, L. E. V.; LEMBKE, C. G.; COSTA, M. D. L.; NISHIYAMA, M. Y.; VICENTINI, R.; VINCENTZ, M. G. A.; ULIAN, E. C.; MENOSSI, M.; SOUZA, G. M. Sugarcane genes associated with sucrose content. **BMC Genomics** 10:120. 2009.

PARIDA, S. K.; PANDIT, A.; GAIKWAD, K.; SHARMA, T. R.; SRIVASTAVA, P. S.; SINGH, N. K.; MOHAPATRA, T. Functionally relevant microsatellites in sugarcane unigenes. **BMC Plant Biol** 10: 251. 2010.

PARK, C. J.; SEO, Y. S. Heat Shock Proteins: A Review of the Molecular Chaperones for Plant Immunity. *Plant Pathol J.*, 31(4), p. 323–333. 2015. Disponível em: <10.5423/PPJ.RW.08.2015.0150>.

PATERSON, A. H.; BOWERS, J. E.; BRUGGMANN, R.; DUBCHAK, I.; GRIMWOOD, J.; GUNDLACH, H.; HABERER, G.; HELLSTEN, U.; MITROS, T.; POLIAKOV, A.; SCHMUTZ, J.; SPANNAGL, M.; TANG, H.; WANG, X.; WICKER, T.; BHARTI, A. K.; CHAPMAN, J.; FELTUS, F. A.; GOWIK, U.; GRIGORIEV, I. V.; LYONS, E.; MAHER, C. A.; MARTINS, M.; NARECHANIA, A.; OTILLAR, R. P.; PENNING, B. W.; SALAMOV, A. A.; WANG, Y.; ZHANG, L.; CARPITA, N. C.; FREELING, M.; GINGLE, A. R.; HASH, C. T.; KELLER, B.; KLEIN, P.; KRESOVICH, S.; MCCANN, M. C.; MING, R.; PETERSON, D. G.; MEHBOOB-UR-RAHMAN; WARE, D.; WESTHOFF, P.; MAYER, K. F.; MESSING, J.; ROKHSAR, D. S. The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. **Nature** 457, p. 551–556. 2009. Disponível em: <10.1038/nature07723>.

PAUN, O.; BATEMAN, R. M.; FAY, M. F.; HEDRÉN, M.; CIVEYREL, L.; CHASE, M. W. Stable epigenetic effects impact adaptation in allopolyploid orchids (*Dactylorhiza*: Orchidaceae). **Molecular Biology and Evolution**, 27, p. 2465–2473. 2010.

PENG, H.; ZHANG, J. Plant genomic DNA methylation in response to stresses: potential applications and challenges in plant breeding. **Proc Natl Acad Sci U S A** 19, p. 1037–1045, 2009.

PENTERMAN, J.; ZILBERMAN, D.; HUH, J. H.; BALLINGER, T.; HENIKOFF, S.; FISCHER, R. L. DNA demethylation in the Arabidopsis genome. **Proc Natl Acad Sci USA** 104, p. 6752–6757. 2007.

PERERA, M.F.; FILIPPONE, M.P.; RAMALLO, C.J.; CUENYA, M.I.; GARCÍA, M.L.; PLOPER, L.D.; CASTAGNARO, A.P. Genetic diversity among viruses associated with sugarcane mosaic disease in Tucumán, Argentina. **Phytopathology**, v.99, p. 38-49, 2009.

PÉREZ-FIGUEROA A. msap: a tool for the statistical analysis of methylation-sensitive amplified polymorphism data. **Molecular Ecology Resources**. 2013 Disponível em: <10.1111/1755-0998.12064>.

PERRY, J.; ZHAO, Y. The CW domain, a structural module shared amongst vertebrates, vertebrate-infecting parasites and higher plants. **Trends Biochem. Sci.** 28, p. 576-580. 2003.

PESTOVA, T. V.; KOLUPAEVA, V. G.; LOMAKIN, I. B.; PILIPENKO, E. V.; SHATSKY, I. N.; AGOL, V. I.; HELLEN, C. U. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 98, p. 7029–7036. 2001. Disponível em: <10.1073/pnas.111145798>.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.** , 29:E45. 2001.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Res** 30, e36. 2002.

PICHLMAIR, A.; KANDASAMY, K.; ALVISI, G.; MULHERN, O.; SACCO, R.; HABJAN, M.; BINDER, M.; STEFANOVIC, A.; EDERLE, C. A.; GONÇALVES, A.; BURCKSTUMMER, T.; MULLER, A. C.; FAUSTER, A.; HOLZE, C.; LINDSTEN, K.; GOODBOURN, S.; KOCHS, G.; WEBER, F.; BARTENSCHLAGER, R.; BOWIE, A. G.; BENNETT, K. L.; COLINGE, J.; SUPERTI-FURGA, G. Viral immune modulators perturb the human molecular network by common and unique strategies. **Nature** 487, p.486–90. 2012. Disponível em: <10.1038/nature11289>.

PIKAARD, C. S.; MITTELSTEN SCHEID, O. Epigenetic regulation in plants. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 1;6(12):a019315. 2014. Disponível em: <10.1101/cshperspect.a019315>.

PIPERIDIS, N.; JACKSON, P.A.; D'HONT, A., BESSE, P.; HOARAU, J. Y.; COURTOIS, B.; AITKEN, K. S.; MCINTYRE, C. L. Comparative genetics in sugarcane enables structured map enhancement and validation of marker–trait associations. **Mol Breed** 21, p. 233-247. 2008.

PLONGTHONGKUM, N.; DIEP, D. H.; ZHANG, K. Advances in the profiling of DNA modifications: cytosine methylation and beyond. **Nat Rev Genet** 15, p. 647–661. 2014.

POULIN, R.; THOMAS, F. Epigenetic effects of infection on the phenotype of host offspring: parasites reaching across host generations. **Oikos** 117, p. 331–335, 2008.

PRASCH, C. M. & SONNEWALD, U. Simultaneous application of heat, drought, and virus to *Arabidopsis* plants reveals significant shifts in signaling networks. **Plant Physiol** 162, p.1849–1866. 2013.

RABOIN, L. M.; OLIVEIRA, K. M.; LECUNFF, L.; TELISMART, H.; ROQUES, D.; BUTTERFIELD, M.; HOARAU, J. Y.; D'HONT, A. Genetic mapping in sugarcane, a high polyploidy, using bi-parental progeny: identification of a gene controlling stalk colour and a new rust resistance gene. **Theor Appl Genet** 113, p.1382–1391. 2006. Disponível em: < 10.1007/s00122-006-0240-3>.

RAIRDAN, G. J., COLLIER, S. M., SACCO, M. A., BALDWIN, T. T., BOETTRICH, T., ANDMOFFETT, P. The coiled-coil and nucleotide binding domains of the potato Rx disease resistance protein function in pathogen recognition and signaling. **Plant Cell** 20, p. 739–751. 2008. Disponível em: <10.1105/tpc.107.056036>.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.; MOORMAN, A.F. Assumption free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neurosci Lett** 13, p. 62–66. 2003.

RAMEGOWDA, V., and SENTHIL-KUMAR, M. The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: mechanistic understanding from drought and pathogen combination. **J. Plant Physiol** 176, p. 47–54. 2015. Disponível em: <10.1016/j.jplph.2014.11.008>.

RAMSAHOYE, B. H., BINISZKIEWICZ, D.; LYKO, F.; CLRK, V.; BIRD, A. P.; JAENISCH, R. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, p. 5237–5242. 2000.

RANDO, O.J.; VERSTREPEN, K.J. Timescales of genetic and epigenetic inheritance. **Cell** 128, p. 655–668. 2007.

RAPP, R.A.; WENDEL, J.F. Epigenetics and plant evolution. **New Phytol.** 168, p. 81–91, 2005.

RAVENSDALE, M.; NEMRI, A.; THRALL, P. H.; ELLIS, J. G.; DODDS, P. N. Co-evolutionary interactions between host resistance and pathogen effector genes in flax rust disease. **Mol Plant Pathol.** 12(1), p. 93–102. 2011.

RESTREPO, M. A.; FREED, D. D.; CARRINGTON, J. C. Nuclear transport of plant potyviral proteins. **Plant Cell** 2, p. 987–998. 1990.

REVERS, F.; NICAISE, V. “Plant resistance to infection by viruses,” in **Encyclopedia of Life Sciences**, ed. Wiley-Blackwell (Chichester: John Wiley & Sons Ltd). 2014. Disponível em: <10.1002/9780470015902.a0000757.pub3>.

RICHARDS, C. L.; SCHREY, A. W.; PIGLIUCCI, M. Invasion of diverse habitats by few Japanese knotweed genotypes is correlated with epigenetic differentiation. **Ecology Letters**, 15, p. 1016–1025. 2012.

RICHARDS, E.J. Natural epigenetic variation in plant species: a view from the field. **Curr. Opin. Plant Biol.** 14, p. 204–209, 2011.

RICHARDS, E.J. Quantitative epigenetics: DNA sequence variation need not apply. **Genes Dev.** 23, p. 1601–1605, 2009.

RIGAS, S.; DARAS, G.; TSITSEKIAN, D.; ALATZAS, A.; HATZOPOULOS, P. Evolution and significance of the Lon gene family in Arabidopsis organelle biogenesis and energy metabolism. **Frontiers in plant science**. Volume 5. Article 145. 2014. Disponível em: < 10.3389/fpls.2014.00145>.

ROACH, B. Nobilisation of sugarcane. **Proc Int Soc Sugar Cane Technol** 14, p.206–216. 1972.

ROBERTS, D. Acquired resistance to tobacco mosaic virus transmitted to the progeny of hypersensitive tobacco. **Virology** 124, p. 161–163, 1983.

ROCHA, F. R.; PAPINI-TERZI, F. S.; NISHIYAMA, M. Y. Jr; VENCIO, R. Z.; VICENTINI, R.; DUARTE, R. D.; DE ROSA, V. E. Jr; VINAGRE, F.; BARSALOBRES, C.; MEDEIROS, A. H.; RODRIGUES, F. A.; ULIAN, E. C.; ZINGARETTI, S. M.; GALBIATTI, J. A.; ALMEIDA, R. S.; FIGUEIRA, A. V. O.; HEMERLY, A. S.; SILVA-FILHO, M. C.; MENOSSI, M.; SOUZA, G. M. Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. **BMC Genomics** 8:71. 2007.

ROMANEL, E.; SILVA, T. F.; CORRÊA, R. L.; FARINELLI, L.; HAWKINS, J. S.; SCHRAGO, C. E.; VASLIN, M. F. Global alteration of microRNAs and transposon-derived small RNAs in cotton (*Gossypium hirsutum*) during *Cotton leafroll dwarf polerovirus* (CLRDV) infection. **Plant Mol. Biol.** 80, p. 443–460. 2012.

ROOSSINCK, M. J. Plant virus metagenomics: biodiversity and ecology. **Annu Rev Genet** 46, p. 359–369. 2012.

ROSE, N. R.; KLOSE, R. J. Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. **Biochim. Biophys. Acta** 1839, p. 1362–1372, 2014.

RUIZ-FERRER, V.; VOINNET, O. Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. **Annu. Rev. Plant Biol.** 60, p. 485–510. 2009.

SAHU, P.P.; PANDEY, G.; SHARMA, N.; PURANIK, S.; MUTHAMILARASAN, M.; PRASAD, M. Epigenetic mechanisms of plant stress responses and adaptation. **Plant Cell Rep** 32 p.1151–1159, 2013.

SALMON, A. ; CLOTAULT, J. ; JENCZEWSKI, E. ; CHABLE, V.; MANZANARES-DAULEUX, M. J. *Brassica oleracea* displays a high level of DNA methylation polymorphism. **Plant Sci**;174(1), p. 61–70, 2008.

SANCHEZ, R.; ZHOU, M. M. The PHD Finger: A Versatile Epigenome Reader. *Trends Biochem Sci.*, 36(7), p. 364-372. 2011. Disponível em: <10.1016/j.tibs.2011.03.005>.

SANGUINO, A. "As principais doenças da cana-de-açúcar" in **Curso à Distância Tópicos Da Cultura de Cana-De-Açúcar**, Ribeirão Preto, Brazil:Instituto Agrônômico, 2012.

SARRIS, P. F.; CEVIK, V.; DAGDAS, G.; JONES, J. D. G.; KRASILEVA, K. V. Comparative analysis of plant immune receptor architectures uncovers host proteins likely targeted by pathogens. **BMC Biol.** 14: 8. 2016.

SCHAEFER M. RNA 5-methylcytosine analysis by bisulfite sequencing. **Methods Enzymol** 560, p. 297–329. 2015.

SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R.W.; BROWN, P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science** 270, p. 467–470.1995.

SCHÜBELER, D. Function and information content of DNA methylation. **Nature** 517, p. 321-326. 2015.

SCHULZ, B.; ECKSTEIN, R. L.; DURKA W. Scoring and analysis of methylation-sensitive amplification polymorphisms for epigenetic population studies. **Molecular Ecology Resources**, 13, p. 642–653. 2013.

SCHWESSINGER, B.; RONALD,P. C. Plant innate immunity: perception of conserved microbial signatures. **Annu. Rev. PlantBiol.** 63, p. 451–482. 2012. Disponível em: < 10.1146/annurev-arplant-042811-105518>.

SEO, Y. S.; ROJAS, M. R.; LEE, J. Y.; LEE, S. W.; JEON, J. S., RONALD, P.; LUCAS, W. J.; GILBERTSON, R. L. A viral resistance gene from common bean functions across plant families and is up-regulated in a non-virus-specific manner. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 103, p. 11856–11861. Disponível em: <10.1073/pnas.0604815103>.

SEO, J. S.; JOO, J.; KIM, M. J.; KIM, Y. K.; NAHM, B. H.; SONG, S. I.; CHEONG, J. J.; LEE, J. S.; KIM, J. K.; CHOI, Y. D. OsbHLH148, a basic helix-loop-helix protein, interacts with OsJAZ proteins in a jasmonate signaling pathway leading to drought tolerance in rice. **Plant J.**, 65, p. 907–921. 2011.

SERRE, D.; LEE, B. H.; TING, A.H. MBD-isolated genome sequencing provides a high-throughput and comprehensive survey of DNA methylation in the human genome. **Nucleic Acids Res** 38, p. 391–399. 2010.

SETTA, N.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; METCALFE, C. J.; CRUZ, G. M. Q.; DEL BEM, L. E. V.; VICENTINI R.; NOGUEIRA, F. T.; CAMPOS, R. A.; NUNES, S. L.; TURRINI, P. C.; VIEIRA, A. P.; OCHOA CRUZ, E. A.; CORRÊA, T. C.; HOTTA, C. T.; DE MELLO, V. A.; VAUTRIN, S.; DA TRINDADE, A. S.; DE MENDONÇA, V. M.; LEMBKE, C. G.; SATO, P. M.; DE ANDRADE, R. F.; NISHIYAMA, M. Y.; CARDOSO-SILVA, C. B.; SCORTECCI, K. C.; GARCIA, A. A.; CARNEIRO, M. S.; KIM, C.; PATERSON, A. H.; BERGÈS, H.; D'HONT, A.; DE SOUZA, A. P.; SOUZA, G. M.; VINCENTZ, M.; KITAJIMA, J. P.; VAN SLUYS, M. A. Building the sugarcane genome for biotechnology and identifying evolutionary trends. **BMC Genomics** 15, p. 540. 10.1186/1471-2164-15-540. 2014.

SHATTUCK, V.I. Glucosinolates and glucosinolate degradation in seeds from turnip mosaic virus-infected rapid cycle *Brassica campestris* L. plants. **J. Exp. Bot.** 44, p. 963–970. 1993.

SHUKLA, S.; KAVAK, E.; GREGORY, M.; IMASHIMIZU, M.; SHUTINOSKI, B.; KASHLEV, M.; OBERDOERFFER, P.; SANDBERG, R.; OBERDOERFFER, S. CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. **Nature** 479(7371), p. 74–79. 2011.

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W.; BRUNT, A. A. **The potyviridae**. Cambridge: Cambridge University Press, 1994. 516 p.

SJÖGREN, L. L.; MACDONALD, T. M.; SUTINEN, S.; CLARKE, A. K. Inactivation of the *clpC1* gene encoding a chloroplast Hsp100 molecular chaperone causes growth retardation, leaf chlorosis, lower photosynthetic activity, and a specific reduction in photosystem activity, and a specific reduction in photosystem content. **Plant Physiol.**,136(4), p. 4114-26. 2004. Disponível em: <10.1104/pp.104.053835>.

SMEKALOVA, V.; DOSKOCILOVA, A.; KOMIS, G.; SAMAJ, J. Cross talk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signaling in plants. **Biotechnol. Adv.** 32, p. 2–11. 2014. Disponível em: <10.1016/j.biotechadv.2013.07.009>.

SPARKS, A. N. *Schizaphis graminum* adults on *Sorghum bicolor*, USA. "Purple coloration of leaf is typical of greenbug infestation." **University of Georgia, Bugwood.org.** 2004. Disponível em: <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Schizaphis\\_graminum\\_adults\\_on\\_sorghum\\_bicolor.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Schizaphis_graminum_adults_on_sorghum_bicolor.jpg)>.

SPOEL, S. H.; DONG, X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. **Nat. Rev. Immunol.** 12, p. 89–100. 2012. Disponível em: <10.1038/nri3141>.

STAVRINIDES, J.; MCCANN, H.C.; GUTTMAN, D.S. Host-pathogen interplay and the evolution of bacterial effectors. **Cell Microbiol.** 10(2), p. 285–92. 2008.

SUNTIO, T. ; MÄKINEN, K. Abiotic stress responses promote *Potato virus A* infection in *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Pathol* 13, p. 775–784. 2012.

SUZUKI, N.; YAMAGUCHI, Y.; KOIZUMI, N.; SANO, H. Functional characterization of a heavy metal binding protein Cdl19 from *Arabidopsis*. **Plant J** 32, p. 165–173. 2002.

SUZUKI, M.M.; BIRD, A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. **Nature Reviews in Genetics** 9, p. 465–476, 2008.

SWAMINATHAN, K.; ALABADY, M.; VARALA, K.; DE PAOLI, E.; HO, I.; ROKHSAR, D. S.; ARUMUGANATHAN, A. K.; MING, R.; GREEN, P. J.; MEYERS, B. C.; MOOSE, S. P.; HUDSON, M. E. Genomic and small RNA sequencing of *Miscanthus x giganteus* shows the utility of sorghum as a reference genome sequence for *Andropogoneae* grasses, **Genome Biol**, vol.11 p. R12. 2010.

SZYMCZYK, P.; GRABKOWSKA, R.; SKAŁA, E.; ZEBROWSKA, M.; BALCERCZAK, E.; JELEN, A. Isolation and characterization of a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 2 promoter from *Salvia miltiorrhiza*. **J. Plant Biochem. Biotechnol.**, p. 1-14. 2017. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s13562-017-0434-6>>.

TAKEDA, S.; PASZKOWSKI, J. DNA methylation and epigenetic inheritance during plant gametogenesis. **Chromosoma** 115, p. 27–35, 2006.

TANI, E.; POLIDOROS, A.N.; NIANIOU-OBEIDAT, I.; TSAFTARIS, A. S. DNA methylation patterns are differentially affected by planting density in maize inbreds and their hybrids. **Maydica** 50, p. 19–23. 2005.

TEAKLE, D.S.; SHUKLA, D.D.; FORD, R.E. *Sugarcane mosaic virus*. In:\_\_\_\_\_. **AAB descriptions of plant viruses**. UK, Wellesbourne: Warwick, 1989. n. 342.

TEHSEEN, M.; CAIRNS, N.; SHERSON, S.; COBBETT, C. S. Metallochaperone-like genes in *Arabidopsis thaliana*. **Metallomics** 2, p. 556–564. 2010.

THALER, J.S., HUMPHREY, P.T.; WHITEMAN, N. K. Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. **Trends Plant Sci.** 17, p. 260–270. 2012. Disponível em: < [10.1016/j.tplants.2012.02.010](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.02.010)>.

THOMMA, B. P. H. J.; NÜRNBERGER, T.; JOOSTEN, M. H. A. J. Of PAMPs and effectors: The blurred PTI-ETI dichotomy. **Plant Cell** 23, p. 4–15. 2011.

TON, J.; MAUCH-MANI, B. Gamma-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. **PlantJ** 38, p.119–130. 2004. Disponível em: <[10.1111/j.1365-313X.2004.02028.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02028.x)>.

TOYOTA, M.; HO, C.; AHUJA, N.; JAIR, K.W.; LI, Q.; OHE-TOYOTA, M.; BAYLIN, S.B.; ISSA, J.P. Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. **Cancer Res** 59:2307–2312, 1999.

TRIPATHI, L. P., SOWDHAMINI, R. Cross genome comparisons of serine proteases in *Arabidopsis* and rice. **BMC Genomics**. 7, p. 200–231. 2006.

TRUNIGER, V.; ARANDA, M. A. Recessive resistance to plant viruses. **Adv. Virus Res.** p.119–159. 2009. Disponível em: <10.1016/S0065-3527(09)07504-6>.

TSUDA, K.; SATO, M.; GLAZEBROOK, J.; COHEN, J. D.; KATAGIRI, F. Interplay between MAMP-triggered and SA-mediated defense responses. **Plant J.** 53, p. 763–775. 2008. Disponível em: <10.1111/j.1365-313X.2007.03369.x>.

UCHIYAMA, A.; SHIMADA-BELTRAN, H.; LEVY, A.; ZHENG, J. Y.; JAVIA, P. A.; LAZAROWITZ, S. G. The *Arabidopsis* synaptotagmin SYTA regulates the cell-to-cell movement of diverse plant viruses. **Front. Plant Sci.** 5, p. 584. 2014.

UEDA, H.; YAMAGUCHI, Y.; SANO, H. Direct interaction between the tobacco mosaic virus helicase domain and the ATP-bound resistance protein, N factor during the hypersensitive response in tobacco plants. **Plant Mol. Biol.** 61, p. 31–45. 2006. Disponível em: <10.1007/s11103-005-5817-8>.

UZAROWSKA, A.; DIONISIO, G.; SARHOLZ, B.; PIEPHO, H. P.; XU, M.; INGVARSEN, C. R.; WENZEL, G.; LUBBERSTEDT, T. Validation of candidate genes putatively associated with resistance to SCMV and MDMV in maize (*Zea mays* L.) by expression profiling. **BMC Plant Biol.** 9, p. 15-10. 2009. Disponível em: <1186/1471-2229-9-15>.

VALLI, A.; GARCÍA, J. A.; LÓPEZ-MOYA, J. J. Potyviridae. **eLS**, p. 1–10. 2015.

VETTORE, A. L.; DA SILVA, F. R.; KEMPER, E. L.; SOUZA, G. M.; DA SILVA, A. M.; FERRO, M. I.; HENRIQUE-SILVA, F.; GIGLIOTI, E. A.; LEMOS, M. V.; COUTINHO, L. L.; NOBREGA, M. P.; CARRER, H.; FRANÇA, S. C.; BACCI JÚNIOR, M.; GOLDMAN, M. H.; GOMES, S. L.; NUNES, L. R.; CAMARGO, L. E.; SIQUEIRA, W. J.; VAN SLUYS, M. A.; THIEMANN, O. H.; KURAMAE, E. E.; SANTELLI, R. V.; MARINO, C. L.; TARGON, M. L.; FERRO, J. A.; SILVEIRA, H. C.; MARINI, D. C.; LEMOS, E. G.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; TAMBOR, J. H.; CARRARO, D. M.; ROBERTO, P. G.; MARTINS, V. G.; GOLDMAN, G. H.; DE OLIVEIRA, R. C.; TRUFFI, D.; COLOMBO, C. A.; ROSSI, M.; DE ARAUJO, P. G.; SCULACCIO, S. A.; ANGELLA, A.; LIMA, M. M.; DE ROSA JÚNIOR, V. E.; SIVIERO, F.; COSCRATO, V. E.; MACHADO, M. A.; GRIVET, L.; DI MAURO, S. M.; NOBREGA, F. G.; MENCK, C. F.; BRAGA, M. D.; TELLES, G. P.; CARA, F. A.; PEDROSA, G.; MEIDANIS, J.; ARRUDA, P. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome Res** 13, p. 2725–2735. 2003.

VISWANATHAN , R.; KARUPPAIAH , R.; BALAMURALIKRISHNAN, M. Impact of Mosaic Infection on Growth and Yield of Sugarcane. **Sugar tech**, Gandharva Mahavidyalaya, v. 7, n. 1, p. 61-65. 2005.

VISWANATHAN, R.; BALAMURALIKRISHNAN, M.; KARUPPAIAH, R. Characterization and genetic diversity of sugarcane streak mosaic virus causing mosaic in sugarcane. **Virus Genes** 36, p. 553–564, 2008.

VISWANATHAN, R.; MOHANRAJ, D. Detection of sugarcane viral diseases by serological, techniques. In: RAO, G. P.; FORD, R. E.; TOSIC, M. S.; TEAKLE, D. S. (Ed.). **Sugarcane pathology**. Enfield (NH): Virus and Phytoplasma Diseases, Science Publishers, v. 11, p.195-208. 2

VOS, P., HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIKTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, 23, p. 4407–4414.1995.

VUYLSTEKE, M.; PELEMAN, J. D.; VAN EIJK, M. J. T. AFLP-based transcript profiling (cDNA-AFLP) for genome-wide expression analysis. **Nat Protoc** 2, p.1399–1413. 2007.

WACLAWOVSKY, A. J.; SATO, P. M.; LEMBKE, C. G.; MOORE, P. H.; SOUZA, G. M. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnol J** 8, p.263-276. 2010.

WADA, Y.; MIYAMOTO, K.; KUSANO, T.; SANO, H. Association between upregulation of stress-responsive genes and hypomethylation of genomic DNA in tobacco plants. **Mol Genet Genom**; 271(6), p. 658–66, 2004.

WANG, A.; KRISHNASWAMY, S. Eukaryotic translation initiation factor 4E- mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement. **Mol. Plant Pathol.** 13, p. 795–803. 2012. Disponível em: <10.1111/j.1364-3703.2012.00791.x>.

WANG, W.; VINOCUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **TRENDS in Plant Science.** Vol.9 No.5. May, 2004

WATERWORTH, W. M.; BRAY, C. M. Enigma variations for peptides and their transporters in higher plants. **Ann Bot** (Lond) 98, p. 1–8. 2006.

WEI, T.; HUANG, T. S.; MCNEIL, J.; LALIBERTE´, J. F.; HONG, J.; NELSON, R. S.; WANG, A. Sequential recruitment of the endoplasmic reticulum and chloroplasts for plant potyvirus replication. **J Virol** 84, p.799–809. 2010a.

WEI, T.; ZHANG, C.; HONG, J.; XIONG, R.; KASSCHAU, K. D.; ZHOU, X.; CARRINGTON, J. C.; WANG, A. Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. **PLoS Pathog** 6, e1000962. 2010b.

WEI, T.; WANG, A. Biogenesis of cytoplasmic membranous vesicles for plant potyvirus replication occurs at endoplasmic reticulum exit sites in a COPI- and COPII-dependent manner. **J Virol** 82, p.12252– 12264. 2008.

WU, L.; HAN, Z.; WANG, S.; WANG, X.; SUN, A.; ZU, X.; CHEN, Y. Comparative proteomic analysis of the plant—virus interaction in resistant and susceptible ecotypes of maize infected with sugarcane mosaic virus. *Jour Proteomics* 89, p. 124–140. 2013.

XIONG, Y.; EICKBUSH, T. H. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. **EMBO J.** 9, p. 3353–3362. 1990.

XIONG, Z.; LAIRD, P.W. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. **Nucleic Acids Res** 25, p. 2532–2534. 1997.

XU, Y.; GAN, E. S.; ITO, T. The AT-hook/PPC domain protein TEK negatively regulates floral repressors including MAF4 and MAF5. *Plant Signal Behav.*, 1, 8(8), e25006. 2013. Disponível em: <10.4161/psb.25006>.

XU, W.; ZHANG, N.; JIAO, Y.; LI, R.; XIAO, D.; WANG, Z. The grapevine basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor positively modulates CBF-pathway and confers tolerance to cold-stress in Arabidopsis. *Mol Biol Rep.*, 41(8), p. 5329-42. 2014. Disponível em: <10.1007/s11033-014-3404-2>.

YAMAMOTO, M.; WAKATSUKI, T.; HADA, A. ; RYO, A. Use of serial analysis of gene expression (SAGE) technology. **Journal of Immunological Methods**, vol. 250, no. 1-2, p. 45–66. 2001.

YAMAMOTO, F.; YAMAMOTO, M. A DNA microarray-based methylation-sensitive (MS)-AFLP hybridization method for genetic and epigenetic analyses **Mol. Genet. Genomics**, 2004.

YANAGISAWA, S. The Dof family of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.*, 7(12), p. 555-60. 2002.

YANG, C. Y.; HUANG, Y. B.; TANG, Z. X.; LU, L. M.; LIU, L. Analysis of DNA methylation variation in sibling tobacco (*Nicotiana tabacum*) cultivars. **Afr J Biotechnol** 10, p. 874–881. 2011.

YANG, P.; LÜPKEN, T.; HABEKUSS, A.; HENSEL, G.; STEUERNAGEL, B.; KILIAN, B.; ARIYADASA, R.; HIMMELBACH, A.; KUMLEHN, J.; SCHOLZ, U.; ORDON, F.; STEIN, N. PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE LIKE 5–1 is a susceptibility factor to plant viruses. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 111, p. 2104–2109. 2014. Disponível em: < 10.1073/pnas.1320362111>.

YI, S. Y.; SHIRASU, K.; MOON, J.S.; LEE, S.G.; KWON, S. Y. The activated SA and JA signaling pathways have an influence on flg22-triggered oxidative burst and callose deposition. **PLoS ONE** 9:e88951. 2014. Disponível em: <10.1371/journal.pone.0088951>.

YILMAZ, A.; NISHIYAMA, M. Y. Jr; FUENTES, B. G.; SOUZA, G. M.; JANIES, D.; GRAY, J.; GROTEWOLD, E. GRASSIUS: a platform for comparative regulatory genomics across the grasses. **Plant Physiol** 149, p.171-180. 2009.

YU, S. W.; ZHANG, L. D.; ZUO, K. J.; TANG, D. Q.; SUN, X. F.; TANG, K. X. Brassica napus L. homeodomain leucine zipper gene BnHB6 responds to abiotic and biotic stresses. *J. Integr. Plant Biol.*, 47, p.1236–1248. 2005. Disponível em: < 10.1111/j.1744-7909.2005.00100.x>.

ZAGO, E.; MORSA, S.; DAT, J.F.; ALARD, F.; FERRARINI, A.; INZE', D.; DELLEDONNE, M.; VAN BREUSEGEM, F. Nitric oxide- and hydrogen peroxidereponsive gene regulation during cell death induction in tobacco. **Plant Physiol** 141, p.404–411. 2006.

ZEMACH, A.; GRAFI, G. Methyl-CpG-binding domain proteins in plants: interpreters of DNA methylation. **Trends Plant Sci.** 2007.

ZEMACH, A.; McDANIEL, I. E.; SILVA, P.; ZILBERMAN, D. Genome-wide evolutionary analysis of eucaryotic DNA methylation. *Science* 14, p. 916–9. 2010.

ZHANG, K.; NIU, S.; DI, D.; SHI, L.; LIU, D.; CAO, X.; MIAO, H.; WANG, X.; HAN, C.; YU, J.; LI, D.; ZHANG, Y. Selection of reference genes for gene expression studies in virus-infected monocots using quantitative real-time PCR. **J Biotechnol** 168, p. 7–14. 2013a.

ZHANG, X.; FU, J.; HIROMASA, Y.; PAN, H.; BAI, G. Differentially Expressed Proteins Associated with *Fusarium* Head Blight Resistance in Wheat. **PlosOne**. Volume 8 Issue 12. 2013b.

ZHU, B.; ZHENG, Y.; ANGLIKER, H.; SCHWARZ, S.; THIRY, S.; SIEGMANN, M.; JOST, J.P. 5-Methylcytosine DNA glycosylase activity is also present in the human MBD4 (G/T mismatch glycosylase) and in a related avian sequence. **Proc Natl Acad Sci USA** 28, p. 4157– 4165. 2000.

ZHU, J.; KAPOOR, A.; SRIDHAR, V.V.; AGIUS, F.; ZHU, J. K. The DNA glycosylase/lyase ROS1 functions in pruning DNA methylation patterns in Arabidopsis. **Curr Biol** 17, p. 54–59. 2007.

ZHU, F.; XI, D. H.; YUAN, S.; XU, F.; ZHANG, D.W.; LIN, H. H. Salicylic acid and jasmonic acid are essential for systemic resistance against tobacco mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*. **Mol. Plant Microbe Interact.** 27, p. 567–577. 2014. Disponível em: < 10.1094/MPMI-11-13-0349-R>.

ZILBERMAN, D.; GEHRING, M.; TRAN, R. K.; BALLINGER, T.; HENIKOFF, S. Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. **Nat Genet** 39(1), p. 61–69. 2007.