



Universidade de Brasília
Instituto de Biologia
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Análise de microRNAs em *Arachis duranensis* em resposta a condições de déficit hídrico e infecção por *Meloidogyne arenaria*

MATHEUS DE PAULA CORRÊA

**BRASÍLIA-DF
AGOSTO, 2022**

MATHEUS DE PAULA CORRÊA

Análise de microRNAs em *Arachis duranensis* em resposta a condições de déficit hídrico e infecção por *Meloidogyne arenaria*

Dissertação apresentada à
Universidade de Brasília como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Biologia
Molecular pelo Programa de Pós-graduação
em Biologia Molecular.

Orientador

Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller

Coorientadora

Dra. Priscila Grynberg

BRASÍLIA-DF
AGOSTO, 2022

Sumário

Sumário	iii
Lista de figuras	v
Lista de Tabelas	vii
Agradecimentos	viii
Resumo	ix
Abstract.....	xi
1 Introdução.....	1
1.1 Mudanças climáticas e impactos sobre culturas agrícolas.....	1
1.2 O gênero <i>Arachis</i>	2
1.3 Estresse Abiótico	5
1.4 Déficit Hídrico	7
1.4.1 Vias de sinalização dependente de ABA.....	8
1.4.2 Vias de sinalização independente de ABA.....	12
1.5 Estresse Biótico.....	13
1.5.1 Imunidade vegetal desencadeada por PAMPs (PTI)	15
1.5.2 Imunidade vegetal desencadeada por efetores (ETI)	16
1.5.3 Nematoides do gênero <i>Meloidogyne</i>	18
1.5.4 Interação molecular planta-nematoide	19
1.6 RNAs não codificantes (ncRNAs)	21
1.6.1 sRNAs (small RNAs) em plantas.....	25
1.6.2 MicroRNAs em plantas	27
1.6.3 Anotação de miRNAs em plantas	29
1.6.4 Biogênese dos miRNAs em plantas	33
1.6.5 Mecanismos de ação	36
1.6.6 miRNAs e regulação de respostas vegetais a condições de estresse.....	38
2 Objetivos	43
2.1 Geral	43
2.2 Específicos	43
3 Material e Métodos	44
3.1 Bioensaios e extração do RNA	44
3.2 Sequenciamento de sRNAs via Illumina (sRNA-seq)	44
3.3 Pipeline de análise das bibliotecas obtidas com o sequenciamento	44

3.3.1	Pré-processamento	45
3.3.2	Identificação de loci MIR e quantificação de transcritos	46
3.3.3	Seleção dos loci MIR e curadoria.....	48
3.4	Predição de alvos.....	49
3.5	Análise da expressão diferencial	50
4	Resultados.....	51
4.1	Sequenciamento e pré-processamento	51
4.2	Predição dos precursores e dos mRNAs maduro e <i>star</i>	52
4.3	Curadoria e anotação dos miRNAs de <i>A. duranensis</i>	53
4.4	Predição dos genes alvos dos miRNAs identificados.....	55
4.5	Análise da expressão diferencial	57
4.5.1	Reprodutibilidade das réplicas biológicas das amostras CTRL, INOC e DRY	57
4.5.2	Inoculação com <i>M. arenaria</i>	59
4.5.3	Déficit hídrico	59
5	Discussão.....	62
6	Conclusões	83
7	Perspectivas	85
8	Referências Bibliográficas	86

Lista de figuras

Figura 1: Distribuição geográfica de todas as espécies do gênero <i>Arachis</i> (delimitada pela linha tracejada) e distribuição das espécies pertencentes à seção <i>Arachis</i> (delimitada pela área em cinza escuro) (Bertioli et al., 2011)	2
Figura 2: Seções pertencentes ao gênero <i>Arachis</i> , número de espécies pertencentes a cada seção, subgenomas e número de cromossomos presentes nas espécies de cada seção. Imagem adaptada de Pandey et al., 2020	3
Figura 3: Vias de sinalização responsáveis pela indução da expressão de genes responsivos ao déficit hídrico (via dependente de ABA e via independente de ABA), juntamente com as sequências regulatórias em cis e fatores de transcrição componentes de cada via. Imagem adaptada de Roychoudhury et al., 2013.....	12
Figura 4: Presença de galhas em raízes de plantas de amendoim, sintoma característico de infecção por <i>Meloidogyne arenaria</i> . Fonte da imagem: https://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5442267	18
Figura 5: Esquema ilustrativo dos processos de PTI e ETI, juntamente com os componentes das respectivas vias de transdução de sinal e genes regulados, com destaque para interações e pontos de convergência entre os 2 processos. Imagem adaptada de Yuan et al., 2021	21
Figura 6: Diferentes grupos de RNAs não codificantes (ncRNAs estruturais e ncRNAs regulatórios) e seus respectivos subgrupos. Imagem adaptada de Waititu et al., 2020. (Bhogireddy et al., 2021).	25
Figura 7: Exemplos de miRNA válido (à esquerda) e inválido de acordo com os critérios para anotação de miRNAs definidos na revisão de 2018. Imagem adaptada de Axtell & Meyers, 2018.	33
Figura 8: Esquema do processo de biogênese e regulação da expressão gênica realizada por miRNAs. Imagem adaptada de Wang et al., 2019.	34
Figura 9: Esquema geral do pipeline de bioinformática desenvolvido pelo LBI para análise de dados provenientes de sRNA-Seq.....	45
Figura 10: Número de loci identificados em famílias de miRNAs de plantas.....	54
Figura 11: Visualização da estrutura secundária e cobertura de leitura gerada pelo programa	

strucVis. A, B e C: visualização de três loci MIR conservados (miR164, miR172 e miR390, respectivamente); D: visualização do locus inédito novo20.	55
Figura 12: Análise de componente principal de cada amostra (à esquerda de cada figura) e heatmap da matriz de distâncias euclidianas entre amostras (à direita de cada figura). A e B: análises dos dados brutos de cada biblioteca. C e D: análises com os dados normalizados de cada biblioteca. A e C: dados do mireap. B e D: dados do Shortstack. Padrão de cores: verde – controles, vermelho – déficit hídrico e roxo – inoculados.	58
Figura 13: Modelo proposto para a resposta de células de tecidos radiculares de <i>A. duranensis</i> submetidas a inoculação por juvenis J2 da espécie <i>M. arenaria</i>	71
Figura 14: Modelo proposto para respostas de células de tecidos radiculares de <i>A. duranensis</i> submetidas a condições de deficit hídrico.	82

Lista de Tabelas

Tabela 1: Número de leituras (e suas porcentagens) de cada amostra: arquivo bruto, após o cutadapt, quantidade contaminantes e dados finais após o mapeamento com o bowtie. CTRL = controle, INOC = inoculado com <i>M. arenaria</i> e DRY = déficit hídrico	51
Tabela 2: Resultados obtidos com os programas Shortstack e mireap/Shortstack. Número de candidatos a genes MIR identificados por código de classificação, comprimento médio do precursor, número médio de leituras por cluster e tamanho médio da sequência do miRNA maduro prevista para diferentes classes definidas pelo ShortStack.....	53
Tabela 3: Loci MIR identificados pelo pipeline (conservados e inéditos) e respectivos genes alvo preditos pelo programa psRNATarget.....	56
Tabela 4: Famílias de miRNA com loci diferencialmente expressos, posição genômica dos loci diferencialmente expressos pertencentes a cada família, valor do log ₂ FC (log ₂ de Fold Change), valor do FDR ('False Discovery Rate'), alteração da expressão e programa preditor responsável pela identificação do locus/loci (INOC x CTRL).....	59
Tabela 5: Famílias de miRNA com loci diferencialmente expressos, posição genômica dos loci diferencialmente expressos pertencentes a cada família, valor do log ₂ FC (log ₂ de Fold Change), valor do FDR ('False Discovery Rate'), alteração da expressão e programa preditor responsável pela identificação do locus/loci (DRY x CTRL).....	60

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa de estudos durante o período de mestrado.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo espaço, infraestrutura e recursos operacionais disponibilizados para execução do projeto.

Ao meu orientador, professor Dr. Robert Neil Gerard Miller, pelo acolhimento, apoio e paciência durante o período de execução do projeto e escrita da dissertação.

Aos meus orientadores, Dra. Priscila Grynberg e Dr. Roberto Togawa, por todo o acolhimento, carinho, apoio, amizade, companhia e paciência comigo durante todo o período do mestrado em que estivemos juntos. Estas breves palavras são muito pouco para expressar tudo o que tenho que agradecer à Priscila e ao Togawa. Vou levar para o resto da minha vida as boas experiências que compartilhamos no Laboratório de Bioinformática (LBI) do CENARGEN.

Aos amigos Guilherme e Letícia, com os quais pude dividir bons momentos durante o período do mestrado.

Ao Dr. Marcos Mota, com o qual pude dividir bons momentos durante o período em que estive no Laboratório de Bioinformática (LBI) do CENARGEN.

Aos meus pais, Lucien e Cristiane, por sempre me apoiarem e me encorajarem em todas as empreitadas e por sempre estarem lá quando mais precisei.

Resumo

É previsto que as mudanças climáticas em curso irão intensificar a ocorrência de eventos climáticos extremos e agravar o impacto de pragas e patógenos sobre a produção agrícola, colocando em risco a segurança alimentar de uma população em contínuo crescimento. Dentro deste contexto, a cultura do amendoim apresenta grande relevância por constituir importante fonte nutricional, sendo cultivada, predominantemente, em trópicos semiáridos por agricultores com poucos recursos. O déficit hídrico e a infecção por nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.) representam condições de estresse que impõe significativas limitações à produção da espécie cultivada de amendoim (*Arachis hypogaea*), sendo que seus parentes silvestres representam importante fonte de tolerância/resistência estas condições e o seu estudo pode contribuir para aprofundar o conhecimento sobre mecanismos de resposta ao estresse, os quais podem ser utilizados em programas de melhoramento ou para o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas. Dentre os mecanismos de controle da expressão gênica, a regulação pós-transcricional realizada por microRNAs, uma classe de pequenos RNAs regulatórios, exerce papel fundamental nos processos de crescimento, desenvolvimento e resposta a condições de estresse abiótico e biótico em organismos vegetais. No presente estudo, a fração de pequenos RNAs de amostras de tecidos radiculares de plantas de *Arachis duranensis* submetidas à diminuição gradual de água no solo ou inoculadas com juvenis J2 da espécie *Meloidogyne arenaria* foram sequenciadas (sRNA-Seq) e os dados resultantes foram analisados com o objetivo de identificar loci MIR conservados e inéditos, verificar loci MIR diferencialmente expressos e prever os genes alvo putativos de loci MIR identificados. Foram identificadas 32 famílias conservadas de miRNAs e 21 loci MIR inéditos, com a predição de genes alvo putativos para a maioria dos loci identificados. A análise da expressão diferencial revelou cinco famílias de miRNAs conservados e um locus MIR inédito diferencialmente expressos em amostras inoculadas, enquanto 18 famílias de miRNAs conservados e cinco loci MIR inéditos foram diferencialmente expressos em amostras submetidas a déficit hídrico. Em plantas inoculadas, as principais vias metabólicas influenciadas pelos miRNAs diferencialmente expressos estão relacionadas à biossíntese de ácido jasmônico (JA), à via de sinalização de auxinas (AUX) e a modificações da estrutura da parede celular. Sob déficit hídrico, as principais vias metabólicas influenciadas estão relacionadas à via de sinalização

dependente de ABA, à via de sinalização independente de ABA, à via de sinalização de auxinas e à homeostase redox intracelular. Além da identificação de novos loci MIR, os resultados obtidos pelo estudo podem servir como referência para posteriores estudos sobre mecanismos regulatórios em espécies de *Arachis* e para o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas visando a tolerância/resistência a estresses.

Palavras-chave: *Arachis*, seca, *Meloidogyne*, miRNAs, bioinformática

Abstract

Climate change is predicted to intensify the occurrence of extreme weather events and to worsen the damage caused by pests and pathogens on agricultural production, threatening the food safety of an ever-growing world population. In this context, the peanut crop is highly relevant as a nutritional source, being cultivated mainly by low-income growers in semiarid tropics. Drought and root knot nematode (RKN) infection represent stress conditions that impose significant restraints to the production of the peanut cultivated species (*Arachis hypogaea*). The parental wild species represent an important source of tolerance/resistance alleles, with their study contributing to further knowledge about stress response mechanisms, applicable in breeding programs and in the development of novel biotechnological applications. Among the cellular mechanisms controlling gene expression, the post-transcriptional regulation by miRNAs, a subgroup of regulatory sRNAs, is key to many plant biological processes, such as growth, development and adaptation to abiotic and biotic stress conditions. In the present study, the sRNA fraction of root samples belonging to *Arachis duranensis* plants subjected to a gradual decrease in soil water content and *A. duranensis* plants subjected to inoculation with *Meloidogyne arenaria* J2 juveniles were sequenced (sRNA-Seq) and the resulting data was analyzed by a bioinformatics analysis pipeline, with the following main objectives: identification of putative MIR loci (conserved and novel), identification of differentially expressed miRNAs and prediction of identified MIR loci' target genes. 32 conserved miRNA families and 21 novel MIR loci were identified and target genes were found for almost all the identified miRNAs. Differential expression analysis revealed five conserved miRNA families and one novel MIR locus differentially expressed following nematode inoculation, with 18 conserved miRNA families and five novel MIR loci differentially expressed in samples subjected to drought conditions. Upon *M. arenaria* infection, the metabolic pathways most influenced by the differentially expressed miRNAs were related to jasmonic acid (JA) biosynthesis, auxin (AUX) signaling pathway and cell wall structure modifications. Upon gradual soil water content decrease, the metabolic pathways most influenced by the differentially expressed miRNAs were related to the ABA-dependent signaling pathway, the ABA-independent signaling pathway, the auxin signaling pathway and intracellular redox homeostasis. In addition to the identification of novel MIR loci, the results obtained in the

present study contribute to our understanding of regulatory mechanisms in *Arachis* species' and to the development of biotechnological applications for tolerance/resistance to biotic and abiotic stresses.

Keywords: *Arachis*, drought, *Meloidogyne*, miRNA, bioinformatics

1 Introdução

1.1 Mudanças climáticas e impactos sobre culturas agrícolas

De acordo com a revisão de 2019 do relatório World Population Prospects, publicado pela Organização das Nações Unidas (ONU), estima-se o crescimento da população global para 8,5 bilhões, 9,7 bilhões e 10,9 bilhões até os anos de 2030, 2050 e 2100, respectivamente (NATIONS et al., 2019). Juntamente com a projeção de expansão demográfica, novas metodologias analíticas e modelos de simulação utilizados para a confecção do Sexto Relatório de Avaliação da base de ciências físicas para o aquecimento global (AR6), publicado pelo Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC), também pertencente à ONU, demonstram inequivocadamente a influência antropogênica sobre diversas variáveis e fenômenos climáticos, como temperaturas superficiais globais, níveis médios de precipitação, acidificação e incremento da temperatura média de oceanos e concentração atmosférica de gases causadores de efeito estufa (GEEs), como dióxido de carbono, metano e óxido nítrico. O relatório indica que a ação antropogênica já é responsável pelo aumento da ocorrência de eventos climáticos extremos, como ondas de calor, excesso e déficit de precipitações e ciclones tropicais em todas as regiões do globo e prevê incrementos das temperaturas superficiais globais entre 1,2-2,0°C (em cenário com progressiva redução dos níveis de emissão de GEEs até 2040-2060) e 1,9-3,0°C (em cenário com progressivo incremento dos níveis de emissão de GEEs), acompanhado pela intensificação de eventos extremos (IPCC, 2021). Além dos impactos fisiológicos decorrentes de condições de estresse abiótico, o que prejudica mecanismos naturais de tolerância/resistência de plantas ao estresse biótico, a alteração climática prevista também exercerá influência sobre a dispersão, reprodução, duração do ciclo e conjunto de hospedeiros de diversas pragas e fitopatógenos, agravando ainda mais a pressão sobre a produtividade agrícola (CHOUDHARY; KUMARI; FAND, 2019; JUROSZEK et al., 2020).

A segurança alimentar é uma necessidade fundamental do ser humano e a sua garantia a nível global encontra-se entre os principais objetivos internacionais englobados pelos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável das Nações Unidas para 2030 (BROWN et al., 2015). A

agricultura está diretamente relacionada com o conceito de segurança alimentar, além de fornecer matérias-primas para diversas cadeias de valor globais, assumindo elevada importância econômica, social e cultural. A elevada dependência e suscetibilidade de atividades agrícolas a fatores ambientais coloca em risco a garantia de segurança alimentar e a manutenção de cadeias de valor associadas, dentro do âmbito das mudanças climáticas nas próximas décadas (BROWN et al., 2015; HOWDEN et al., 2007).

Deste modo, a integração de diferentes estratégias para a adaptação de sistemas agrícolas aos impactos causados pelas alterações climáticas é fundamental, as quais devem ter uma abordagem multidisciplinar e holística, englobando desde alterações a nível de manejo de sistemas até a investigação e desenvolvimento de novas ferramentas biotecnológicas capazes de incrementar a resiliência e tolerância de culturas agrícolas a fatores bióticos e abióticos, e devem envolver os diversos participantes das cadeias de valor globais, incluindo a iniciativa privada, instituições governamentais nacionais e instituições supranacionais (HOWDEN et al., 2007).

1.2 O gênero *Arachis*

O gênero *Arachis* pertence à família botânica Fabaceae, é endêmico da América do Sul, proveniente da região compreendida entre o sudoeste do estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, e a região nordeste do Paraguai, e, provavelmente, originou-se do gênero *Stylosanthes* (Figura 1).

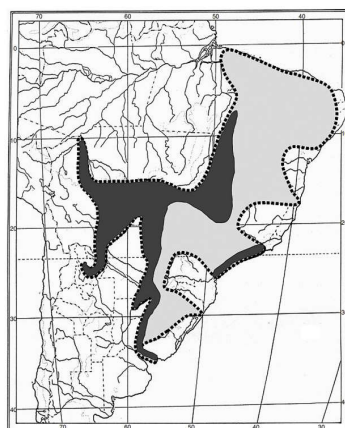


Figura 1: Distribuição geográfica de todas as espécies do gênero *Arachis* (delimitada pela linha tracejada) e distribuição das espécies pertencentes à seção *Arachis* (delimitada pela área em cinza escuro) (Bertioli et al., 2011)

Este gênero possui nove seções taxonômicas intragenéricas (*Arachis*, *Caulorrhizae*, *Erectoides*, *Extranervosae*, *Heteranthae*, *Procumbentes*, *Rhizomatosae*, *Trirectoides* e *Triseminatae*), classificadas com base em características morfológicas, distribuição geográfica e autocompatibilidade, dentre as quais a seção *Arachis* é a maior (32 espécies) e mais diversa (no que diz respeito a estrutura de cariótipos, número de cromossomos e distribuição geográfica), contendo a espécie *A. hypogaea*, amplamente cultivada pelas suas sementes e vages (Figura 2).

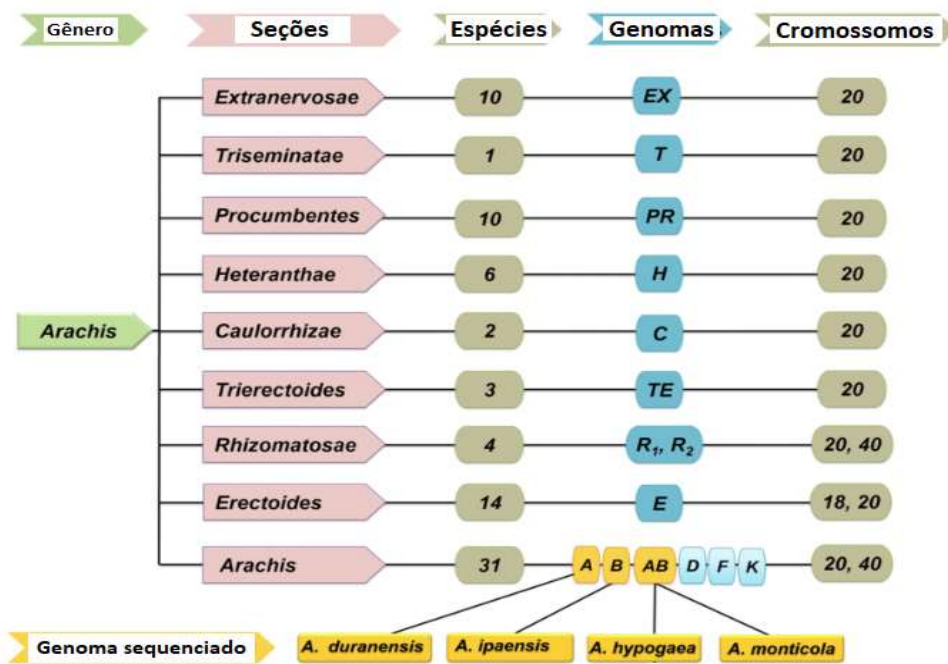


Figura 2: Seções pertencentes ao gênero *Arachis*, número de espécies pertencentes a cada seção, subgenomas e número de cromossomos presentes nas espécies de cada seção. Imagem adaptada de Pandey et al., 2020

Todas as espécies pertencentes ao gênero *Arachis* possuem hábito reprodutivo geocárpico, no qual apenas frutos subterrâneos são formados por meio do desenvolvimento de estrutura especial denominada ginóforo, com predominância da ocorrência de autopolinização. Estes fatores contribuíram para a lenta dispersão e baixo fluxo gênico durante o processo evolutivo (KRAPOVICKAS; GREGORY, 2007). A maioria das espécies de *Arachis* são diploides ($2n = 2x = 20$), com a presença de, principalmente, 2 diferentes subgenomas (A e B), enquanto a espécie cultivada *A. hypogaea* é alotetraploide ($2n = 4x = 40$), com genoma do tipo AABB,

originária, provavelmente, de recente processo de hibridização entre duas espécies diploides (AA x BB), resultando em híbrido estéril, e subsequente poliploidização, responsável pela restauração da fertilidade e isolamento reprodutivo de espécies parentais silvestres (BERTIOLI et al., 2011; KRAPOVICKAS; GREGORY, 2007; SEIJO et al., 2004).

O amendoim (*A. hypogaea*) é uma leguminosa oleaginosa cultivada em regiões tropicais e subtropicais com elevada importância econômica e nutricional (BERTIOLI et al., 2019). É a quarta cultura agrícola oleaginosa mais produzida no mundo, com produção aproximada de 50,6 milhões de toneladas em 2021. Os cinco maiores países produtores de amendoim são a China, Índia, Nigéria, Estados Unidos e Sudão, com o Brasil ocupando a 13ª posição (USDA-FAO, 2022). Na safra 2020/21, a produção nacional total de amendoim foi de, aproximadamente, 597.000 toneladas e o principal estado produtor foi São Paulo (com produção total aproximada de 561.000 toneladas) (CONAB, 2022). Sementes de amendoim são compostas por 40-60% de óleos, 20-40% de proteínas e 10-20% de carboidratos e apresentam elevado conteúdo nutricional, constituindo fonte de vitamina E, niacina, cálcio, fósforo, magnésio, zinco, ferro, riboflavina, tiamina e potássio. São utilizadas para consumo direto, como fonte de óleo vegetal e como fonte proteica para a indústria animal (PANDEY et al., 2012; TOOMER, 2018). Dentre os principais fatores bióticos e abióticos que impactam negativamente a produção de amendoim, encontram-se a infecção por *Meloidogyne arenaria* (espécie de nematoide responsável pela formação de galhas no sistema radicular de plantas infectadas) e o déficit hídrico (PANDEY et al., 2012).

A. hypogaea apresenta estreita base genética, quando comparada a espécies silvestres, o que torna importante a investigação destas espécies, especialmente parentais diplóides com subgenomas A e B, para a busca de possíveis alelos de tolerância/resistência a diferentes condições de estresse biótico e abiótico, além de ampliar a compreensão sobre processos regulatórios responsáveis pelas respostas a estas diferentes condições (BERTIOLI et al., 2016; DE CARVALHO MORETZSOHN et al., 2004; KOCHERT et al., 1991; SEIJO et al., 2004).

A. duranensis é uma espécie diploide ($2n = 2x = 20$) com subgenoma do tipo A, constituindo uma das espécies parentais da espécie cultivada *A. hypogaea* (BERTIOLI et al., 2016; DE CARVALHO MORETZSOHN et al., 2004; KRAPOVICKAS; GREGORY, 2007; SEIJO et al., 2004).

Apresenta tolerância a condições de déficit hídrico por ser originária de regiões com baixa precipitação, o que é constatado pela presença de perfil transpiratório mais conservador, quando comparado com o perfil transpiratório apresentado pela espécie cultivada. Deste modo, representa fonte de alelos de resistência para programas de melhoramento genético e aplicações biotecnológicas, com diversos estudos explorando abordagens ômicas para a busca de genes de resistência candidatos e compreensão de mecanismos regulatórios responsáveis pela resposta desta espécie a diferentes condições de estresse biótico e abiótico (BRASILEIRO et al., 2015; GUIMARÃES et al., 2012).

1.3 Estresse Abiótico

Estresses abióticos são definidos como condições ambientais adversas que reduzem o crescimento e a produtividade vegetal a níveis subótimos e incluem, dentre outros, déficit hídrico, excesso de sais na solução do solo, extremos de temperatura (elevadas/reduzidas temperaturas), deficiências nutricionais e toxicidade por metais pesados. Estresses abióticos influenciam diretamente a distribuição de espécies vegetais e a produtividade de culturas agrícolas (Bailey-Serres et al., 2019). Organismos vegetais desenvolveram mecanismos regulatórios de percepção e adaptação a tais condições, os quais compreendem diferentes camadas de controle da atividade celular e envolvem respostas complexas, dinâmicas, reversíveis/irreversíveis e que apresentam especificidade de acordo com órgão/tecido considerado e tipo, nível e intensidade de estresse aplicado (CRAMER, 2010; PINHEIRO; CHAVES, 2011; SKIRYCZ; INZÉ, 2010).

Condições de estresse abiótico são responsáveis pela alteração de diversos processos celulares, o que pode representar mudanças não-adaptativas, decorrentes do impacto direto do fator de estresse sobre o equilíbrio redox celular ou estrutura de biomoléculas, ou mudanças adaptativas, as quais estão relacionadas à percepção do sinal de estresse, à transdução deste sinal e à conversão destes sinais em respostas celulares, via regulação transcricional, pós-transcricional, traducional e pós-traducional (GUO et al., 2016; JIANG et al., 2019; ZHANG et al., 2015).

A percepção celular do sinal de estresse pode estar relacionada a alterações físicas ou

químicas de biomoléculas causadas pelo fator de estresse, o que, de modo geral, acarreta em alterações da concentração intracelular de cálcio (com intensidade e duração específicas para diferentes fatores de estresse) por meio da regulação de proteínas transportadoras ou canais iônicos, embora outros mecanismos de percepção (formação de agregados proteicos por ruptura da estrutura quaternária e terciária de proteínas pelo calor, por exemplo) também possam atuar no processo de percepção (GUO et al., 2016; JIANG et al., 2019).

O processo de transdução de sinal é responsável pela transmissão e amplificação do sinal de estresse captado pelos mecanismos de percepção e envolve a atuação conjunta de diferentes mensageiros secundários, como, por exemplo, Ca^{2+} , espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive oxygen species*) e fosfolípidios, e diferentes mecanismos de regulação pós-traducionais, com destaque para os processos de fosforilação e desfosforilação, os quais podem controlar a atividade, localização e estabilidade de proteínas de sinalização (GILROY; TREWAVAS, 2001). O influxo de cálcio para o citosol a partir de proteínas transportadoras e canais localizados na membrana plasmática ou na membrana de organelas celulares (MCAINSH; PITTMAN, 2009), a formação de ROS a partir de cadeias transportadoras de elétrons ou de oxidases de NADPH (QI et al., 2018) e a regulação de diferentes vias de sinalização por cascatas de fosforilação de MAP quinases (ZHAO et al., 2017) são exemplos de mecanismos comumente utilizados para a transdução de sinais provenientes de condições de estresse abiótico, os quais podem resultar na regulação de efetores transcricionais, entrada/saída de íons da célula/compartimentos celulares, sinalização retrógrada e regulação transcricional direta (CHAN et al., 2016; GUO et al., 2016; KIM et al., 2013; TANG et al., 2015).

Sob condições de stress abiótico, as respostas transcricionais podem estar relacionadas a duas principais vias de sinalização, a via dependente da sinalização por ácido abscísico (ABA) e a via independente da sinalização realizada por este fitormônio, sendo que, de modo geral, as respostas iniciais estão relacionadas à formação de fatores de transcrição. Posteriormente predomina a expressão de genes controlados por estes fatores de transcrição (KREPS et al., 2002; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2006; ZHU, 2002). O padrão transcricional gerado pode ou não ter especificidade com relação ao estresse aplicado e inclui proteínas relacionadas a cascatas de MAP quinases, sinalização por mensageiros secundários, ajuste osmótico, reparo de danos

celulares, dentre outros processos (CASAL; BALASUBRAMANIAN, 2019; HUA, 2009; MA; BOHNERT, 2007).

Além da regulação a nível transcricional, as respostas a condições de estresse abiótico envolvem diferentes camadas de controle da atividade celular, incluindo alterações na dinâmica da maquinaria de processamento de mRNAs (regulação pós-transcricional) (CHAKRABARTI et al., 2020; DING et al., 2014), alterações na dinâmica do processo de tradução de proteínas (regulação traducional) (MERRET et al., 2015), alterações do estado proteínas pré-formadas ou recém-formadas (regulação pós-traducional) (MATAMOROS; BECANA, 2021), além de envolver alterações a nível de estrutura de cromatina (regulação epigenética) (CHANG et al., 2020) e alterações da expressão de pequenos RNAs não-codificantes com ação regulatória, com destaque para a classe dos miRNAs (regulação pós-transcricional) (SUNKAR et al., 2007; SUNKAR; KAPOOR; ZHU, 2006).

1.4 Déficit Hídrico

O estresse por déficit hídrico ocorre quando a quantidade de água disponível no solo é reduzida e as condições atmosféricas causam perda contínua de água por evaporação e/ou transpiração. As reações de plantas a esta condição variam significativamente em diferentes níveis organizacionais, de acordo com fatores como espécie considerada, fase do desenvolvimento em que o organismo vegetal se encontra, intensidade e duração da condição de estresse (BRAY, 2007). De modo geral, o déficit hídrico moderado resulta em redução do conteúdo de água, menor potencial hídrico em tecidos foliares, fechamento estomático, e diminuição da taxa de crescimento, tanto pela influência sobre a expansão celular como pelo impacto sobre diferentes processos bioquímicos e fisiológicos, como a fotossíntese, respiração celular, absorção de íons, metabolismo de carboidratos, dentre outros. A condição de déficit hídrico severo pode causar a disrupção do metabolismo e estrutura celular, com a subsequente suspensão de reações enzimáticas, necrose de tecidos e órgãos e morte do organismo vegetal (FAROOQ et al., 2008; JALEEL et al., 2008).

As plantas desenvolveram diferentes mecanismos de defesa contra condições de déficit hídrico, dentre os quais destacam-se (i) mecanismos de escape, (ii) mecanismos de evasão e (iii)

mecanismos de tolerância, os quais estão fundamentados na percepção e transdução dos sinais de estresse em diferentes tecidos e na regulação gênica em diferentes níveis (GUPTA; RICO-MEDINA; CAÑO-DELGADO, 2020). Mecanismos de escape permitem às plantas concluir seu ciclo de vida antes da ocorrência de condições de estresse e incluem o estabelecimento de processos de dormência ou senescência, associados à alteração da duração das fases vegetativa ou reprodutiva, como, por exemplo, a antecipação do florescimento (SHAVRUKOV et al., 2017). Mecanismos de evasão consistem na alteração de taxas de crescimento ou estruturas morfológicas, cujo objetivo é a manutenção de processos fisiológicos fundamentais, de modo a evitar os efeitos negativos decorrentes de condições de déficit hídrico (YUE et al., 2006). Dentre as adaptações que compõe essa classe de mecanismos de defesa, encontram-se a redução da perda de água por transpiração através do fechamento estomático, o enrolamento de folhas, mudança do ângulo de inserção de folhas, deposição de ceras na cutícula de tecidos foliares, incremento da profundidade e densidade de raízes e aumento da razão raiz/parte aérea (CAIRNS et al., 2004; GUO et al., 2016). Mecanismos de tolerância estão relacionados à capacidade das plantas de manter determinado nível de processos fisiológicos sob condições de déficit hídrico severo e compreendem a regulação de vias metabólicas para a redução ou restauração de danos ocasionados pela condição de estresse, incluindo a biossíntese de solutos compatíveis e a indução de sistema antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (FANG; XIONG, 2014). As plantas possuem diversos mecanismos moleculares de resposta ao estresse hídrico, que vão desde a percepção celular, através de receptores como o OSCA1, canal de cálcio localizado na membrana plasmática, com regulação de sua abertura (e consequente entrada de cálcio para o interior da célula) possivelmente relacionada à tensão lateral exercida pela bicamada lipídica da membrana sob condições hiperosmóticas (JOJOA-CRUZ et al., 2018; MAITY et al., 2019) até a regulação transcricional de vias dependentes e independentes da sinalização realizada pelo fitormônio ABA (ZHU, 2002).

1.4.1 Vias de sinalização dependente de ABA

ABA é um fitormônio cuja biossíntese ocorre nos plastídios e atua como regulador central de respostas vegetais a condições de estresse abiótico, além de exercer influência sobre diversos

processos de crescimento e desenvolvimento vegetal (NG et al., 2014; XIONG; ZHU, 2003). É classificado como um terpeno, com esqueleto carbônico de 15 carbonos, e se comporta como ácido fraco pela presença do grupo carboxila em cadeias laterais, o que condiciona a sua lipofilicidade e, conseqüentemente, a capacidade de adentrar em células vegetais, ao pH do meio onde se encontra, embora também possa ser transportado através de membranas por meio de proteínas transportados da família ABC (KUROMORI et al., 2010; NAMBARA; MARION-POLL, 2005; NG et al., 2014).

Sob condições de estresse abiótico a quantidade de ABA aumenta em tecidos vegetais para ativar mecanismos como o fechamento estomático, alterações da expressão gênica e respostas fisiológicas adaptativas (FUJITA et al., 2011; KIM et al., 2010; NG et al., 2014). Com a diminuição de sinais de estresse, o ABA é metabolizado em produtos inativos pelos processos de hidroxilação e conjugação (NAMBARA; MARION-POLL, 2005; NG et al., 2014). A sinalização realizada pelo ABA envolve três principais componentes: as proteínas receptoras solúveis PYR (pyrabactin resistance)/PYL (pyrabactin resistance-like)/regulatory component of ABA receptors (RCAR); proteínas fosfatase 2C (PP2C), que atuam como reguladores negativos, e proteínas quinase SnRK2/OST1 (SNF1-related protein kinase 2), as quais atuam como reguladores positivos da sinalização por ABA. Mediante a ligação de ABA às proteínas receptoras, estas são capazes de se ligar às fosfatases ABI1 e ABI2, impedindo a desfosforilação de quinases da família SnRK2, as quais são ativadas por meio de autofosforilação ou fosforilação realizada por outras quinases reguladoras, como a proteína ARK (ABA e *abiotic stress-responsive Raf-like kinase*) (FUJII et al., 2009; ISLAM et al., 2021; MA et al., 2009; PARK et al., 2009; SOON et al., 2012). Em *Arabidopsis thaliana*, foram identificados 10 membros da família de quinases SnRK2, dentre os quais todos os membros, exceto SnRK2.9 são ativados por estresse osmótico e SnRK2.2/3/6/7/8 são ativados também por ABA (BOUDSOCQ; BARBIER-BRYGOO; LAURIÈRE, 2004). Plantas mutantes de *A. thaliana* com disrupção dos 10 membros da família SnRK2 possuem disfunção do acúmulo de ABA induzido por estresse osmótico, além de apresentar disfunção da regulação de diversos genes relacionados à tolerância a este tipo de estresse e redução do acúmulo de prolina e do mensageiro secundário isopentenil trifosfato (IP3), o que sugere que a ativação de proteínas SnRK2 está posicionada a montante do acúmulo de ABA e é necessária para o estabelecimento

de respostas adaptativas a este tipo de estresse (FUJII; VERSLUES; ZHU, 2011). Possíveis fatores a montante que regulam a ativação destas quinases incluem proteínas pertencentes a cascatas de MAP quinases, como proteínas ARK em *A. thaliana*, ou proteínas quinases dependentes de cálcio (como CPKs e CIPKs, por exemplo), uma vez que o sinal primário de hiperosmolaridade é capaz de regular a abertura de canais de cálcio OSCA1, os quais são receptores putativos deste tipo de estresse (ISLAM et al., 2021; SARUHASHI et al., 2015; YUAN et al., 2014).

As proteínas quinases SnRK2 ativadas também regulam a atividade de diversas enzimas, como, por exemplo, ascorbato peroxidase e MnSOD (relacionadas com a inativação de ROS) e fatores de transcrição, proteínas regulatórias capazes de regular a expressão muitos genes alvo através da ligação a motivos específicos em promotores dos genes regulados (FUJITA; YOSHIDA; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2013; UMEZAWA et al., 2010). (figura 3). Dentre os fatores de transcrição regulados por proteínas SnRK2 ativadas, encontram-se:

- ABFs (*ABA-responsive-element Binding Factor*) /AREBs (*ABA-Responsive Element Binding Factors*): ABFs/AREBs pertencem à subfamília de fatores de transcrição bZIP (*basic leucine zipper*) e representam os principais fatores de transcrição a jusante de quinases SnRK2 ativadas na via de transdução de sinal do ABA. Este grupo de proteínas é capaz de se ligar a motivos denominados ABREs (*ABA-response element*), os quais constituem o principal elemento regulatório em cis associado à expressão de genes responsivos a ABA e atuam como reguladores positivos da sinalização realizada por este fitormônio (FUJITA et al., 2011; FUJITA; YOSHIDA; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2013; YOSHIDA et al., 2015).

- ABI5: também pertence à subfamília de fatores de transcrição bZIP e constitui importante regulador de respostas a ABA durante a germinação de sementes e o desenvolvimento de plântulas (BROCARD; LYNCH; FINKELSTEIN, 2002; LOPEZ-MOLINA; MONGRAND; CHUA, 2001).

- RAV1 (relacionado a ABI3/VP1): pertence à família de fatores de transcrição ERF (*Ethylene Responsive Factor*) e constitui um regulador negativo da sinalização realizada por ABA. A fosforilação deste fator de transcrição por quinases SnRK2 é responsável pela repressão de sua atividade, o que indica a função de ativação/repressão de quinases SnRK2 ativadas sobre proteínas regulatórias relacionadas ao controle de vias metabólicas responsivas ao ABA (FENG et

al., 2014, 2005).

Além destes fatores de transcrição, os quais exigem fosforilação mediada por quinases SnRK2 para sua ativação, fatores de transcrição pertencentes às famílias MYB (myeloblastosis) e MYC (myelocytomatosis) também atuam na via de sinalização de ABA como reguladores positivos (ABE et al., 1997, 2003). Em *A. thaliana*, MYB60, MYB44 e MYB15 estão relacionados à regulação do fechamento estomático e respostas à desidratação mediadas por ABA (JARADAT et al., 2013). MYB96 é outro fator de transcrição relacionado a respostas a condições de déficit hídrico, o qual, além de atuar como regulador positivo de genes relacionados à sinalização de ABA, também atua como regulador negativo de genes reprimidos por ABA (LEE; SEO, 2019; SEO et al., 2009). O fator de transcrição MYC2 é um gene responsivo ao ABA induzido sob condições de déficit hídrico (ABE et al., 2003).

O fator de transcrição NAC (NAM: no apical meristem; ATAF: *A. thaliana* transcription activation factor; CUC: cup-shaped cotyledon) também é induzido pelo ABA e a perda de função dos genes que codificam para tais proteínas resultam na postergação da senescência foliar induzida por ABA (LIANG et al., 2014; SHEN et al., 2017). O silenciamento do gene RhNAC3 em pétalas de roseira resultou na repressão de genes a jusante na via de sinalização mediada por ABA (JIANG et al., 2014).

Por fim, os fatores de transcrição WRKY e NF-Y também regulam redes gênicas relacionadas à sinalização exercida pelo ABA. Os fatores de transcrição pertencentes à família WRKY reconhecem o elemento regulatório em cis W-box (TTGACC/T), o qual foi encontrado no promotor de diversos genes responsivos a condições de estresse abiótico (CHEN et al., 2019). Os fatores de transcrição WRKY18, WRKY40 atuam como reguladores positivos, enquanto WRKY60 atua como regulador negativo de genes responsivos ao ABA através de ligação direta ao promotor destes genes (CHEN et al., 2010a). Membros da família NF-Y reconhecem o motivo CCAAT no promotor de genes alvo. Em *A. thaliana*, AtNF-YA5 é induzido por ABA sob condições de déficit hídrico (LI et al., 2008). O fator de transcrição AtNF-YB2 é induzido por vias de sinalização dependentes e independentes de ABA sob condições de déficit hídrico (SATO et al., 2019). A Figura 3 é um esquema das vias de sinalização citadas neste item.

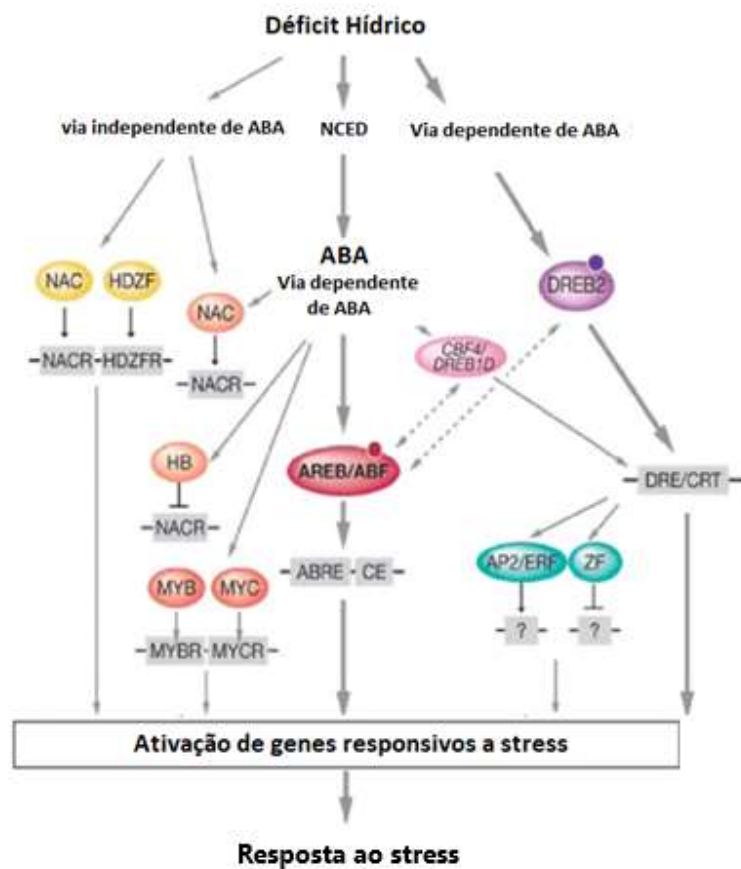


Figura 3: Vias de sinalização responsáveis pela indução da expressão de genes responsivos ao déficit hídrico (via dependente de ABA e via independente de ABA), juntamente com as sequências regulatórias em cis e fatores de transcrição componentes de cada via. Imagem adaptada de Roychoudhury et al., 2013.

1.4.2 Vias de sinalização independente de ABA

Sob condições de estresse hídrico, alguns fatores de transcrição têm a sua expressão induzida de maneira independente à biossíntese ou sinalização de ABA, constituindo via de sinalização independente de ABA (YOSHIDA; MOGAMI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2014). Dentre estes reguladores, encontram-se membros das famílias de fatores de transcrição AP2/ERFs e NACs. Além de estarem relacionados a via de sinalização dependente de ABA, alguns membros da família NAC têm sua expressão induzida por estresse osmótico de modo independente ao ABA

(KIM et al., 2011a; YU et al., 2021).

Os fatores de transcrição DREB constituem uma subfamília da família de fatores de transcrição AP2 (APETALA2) /ERF (ethylene-responsive element-binding factor) específica de plantas (MARUYAMA et al., 2012; SAKUMA et al., 2002). Em *A. thaliana*, existem 6 genes do tipo DREB1/CBF e 8 genes do tipo DREB2, os quais reconhecem os elementos regulatórios em cis DRE (Dehydration Responsive Element) /CRT (C-repeat) presentes em promotores de genes que ativam (Sakuma et al., 2002). De modo geral, fatores de transcrição do tipo DREB1 são rapidamente induzidos por condições de baixas temperaturas e atuam na regulação transcricional de genes relacionados à tolerância a tais condições, como genes de biossíntese de prolina e de açúcares. De modo contrário, fatores de transcrição do tipo DREB2 são altamente induzidos sob condições de estresse osmótico, sendo que DREB2A exerce papel fundamental na regulação da expressão gênica sob condições de estresse salino, enquanto DREB2B atua, principalmente, sobre a expressão gênica sob condições de déficit hídrico, embora diversos genes DREB1 sejam levemente induzidos sob condições de desidratação, o que indica a existência de interação entre as vias de transdução de sinal relacionadas a estes fatores de transcrição (CHENG et al., 2012; MAGOME et al., 2004; NAKASHIMA; ITO; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2009; SAKUMA et al., 2002). Além de fatores de transcrição DREB, o fator de transcrição ERF53 (ethylene response factor 53), pertencente à família AP2/ERF e à subfamília non-DREB2, funciona de maneira similar às proteínas DREB, através da regulação de genes responsivos a condições de déficit hídrico (CHENG et al., 2012).

1.5 Estresse Biótico

Organismos vegetais são constantemente desafiados por diversos patógenos, incluindo vírus, bactérias, fungos, oomicetos e nematoides, os quais, de modo geral, podem ser classificados como biotróficos, hemibiotróficos e necrotróficos, de acordo com as características de seu modo de infecção e nutrição (BIGEARD; COLCOMBET; HIRT, 2015; SPOEL; DONG, 2012). Patógenos biotróficos obtêm nutrientes a partir de tecidos vivos do hospedeiro, enquanto patógenos necrotróficos se nutrem de tecidos mortos do hospedeiro. Organismos patogênicos classificados como hemibiotróficos (SUN et al., 2021) apresentam, no seu ciclo de vida, uma fase

inicial biotrófica seguida por um estágio necrotrófico (KOECK; HARDHAM; DODDS, 2011; LAI; MENGISTE, 2013).

As plantas desenvolveram elaborados mecanismos de defesa contra infecções por patógenos, os quais incluem linha de defesa inicial constitutiva, composta por barreiras físicas e químicas, e linha de defesa induzida através do reconhecimento de moléculas associadas aos patógenos (DANGL; MCDOWELL, 2006; KEMPEL et al., 2011). No que diz respeito a mecanismos de defesa induzidos, diferentemente de animais, organismos vegetais (SUN et al., 2021) não possuem um sistema imunológico definido e dependem de mecanismos de imunidade inata presentes em cada célula, além de moléculas de sinalização sistêmica produzidas em locais de infecção (BONARDI et al., 2012; LAPIN; VAN DEN ACKERVEKEN, 2013). De modo geral, na superfície de células vegetais existem proteínas denominadas PRRs (do inglês “pattern recognition receptors”), as quais reconhecem moléculas conservadas pertencentes a diversos grupos de patógenos, denominadas PAMPs (do inglês “pathogen associated molecular pattern”) e ativam o processo de imunidade desencadeada por PAMPs (PTI, do inglês “pattern-triggered immunity”) (SUN et al., 2021), restringindo a patogenicidade. Para que ocorra uma interação planta/patógeno compatível (estabelecimento do estado de doença), os patógenos desenvolveram métodos para evadir ou suprimir o processo de PTI, através da ação de moléculas secretadas, denominadas efetores, o que resulta na suscetibilidade induzida por efetores (ETS, do inglês “effector-triggered susceptibility”). Por sua vez, as plantas desenvolveram mecanismos de percepção de efetores, resultando na ativação do processo de imunidade desencadeada por efetores (ETI, do inglês “effector-triggered immunity”), no qual a formação de respostas de defesa e a indução do processo de morte celular programada restringem o crescimento e a proliferação do patógeno. Subsequentemente, o processo de ETI pode ser superado através da evolução, diversificação ou perda de efetores por patógenos (JONES; DANGL, 2006; SUN et al., 2021). Esta dinâmica coevolutiva entre patógenos e hospedeiros foi incorporada pelo modelo denominado “zig-zag”, o qual ainda é amplamente aceito para a descrição de patossistemas, embora algumas limitações tenham sido destacadas, como a não inclusão de padrões moleculares associados a danos (DAMPs, do inglês “damage-associated molecular patterns”) e a

exclusão dos efeitos da interação entre plantas e ambiente sobre a ativação/supressão de processos moleculares (PRITCHARD; BIRCH, 2014).

1.5.1 Imunidade vegetal desencadeada por PAMPs (PTI)

O processo de PTI envolve a percepção de PAMPs por proteínas PRR, as quais podem pertencer a duas famílias diferentes de proteínas: RLKs (do inglês “receptor-like kinases”) e RLPs (do inglês “receptor-like proteins”). Membros de ambas as famílias se localizam na membrana plasmática de células vegetais, são capazes de se ligar a moléculas ligantes através de diferentes domínios extracelulares, com destaque para o domínio LRR (do inglês “leucine-rich repeat”) (BOUTROT; ZIPFEL, 2017) e necessitam de correceptores para a transdução de sinais, dentre os quais encontram-se AtBAK1, AtBKK1 e CERK1, por exemplo (CAO et al., 2014; ROUX et al., 2011).

Dentre os PAMPs reconhecidos por proteínas PRR, podem ser citados os peptídeos flg22 e elf18, provenientes de bactérias e reconhecidos pelas proteínas AtFLS2 e AtEFR (CHINCHILLA et al., 2006; ZIPFEL et al., 2006); o polissacarídeo quitina, proveniente da parede celular de fungos e reconhecido pelas proteínas AtLYM2/4/5 e OsLYP4/6 (LIU et al., 2012; WAN et al., 2008); a proteína XEG1, produzida por *Phytophthora infestans* e reconhecida pela proteína NbrXEG1 (WANG et al., 2018) e extratos de *Heterodera schachtii*, os quais são reconhecidos pela proteína AtNLR1 (MENDY et al., 2017).

A ligação de PRRs a PAMPs é responsável pela formação de complexos heterodiméricos (RLKs) ou heterotriméricos (RLPs) entre PRRs e correceptores, o que, após uma série de eventos de autofosforilação e transfosforilação entre os domínios quinase destas proteínas voltados para o citoplasma, resulta na ativação de proteínas RLCKs (do inglês *receptor-like cytoplasmic protein kinase*) por fosforilação (HOHMANN; LAU; HOTHORN, 2017; LIANG; ZHOU, 2018; SUN et al., 2013), as quais, por sua vez, regulam a ativação de diversas proteínas de sinalização, como canais de cálcio, oxidases de NADPH e MAP quinases. O influxo de cálcio para o citosol acarreta a ativação de proteínas quinase dependentes de cálcio (CPK, do inglês “calcium-dependent protein kinase”), as quais regulam a atividade da oxidase de NADPH RbohD, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio no apoplasto e, conseqüentemente, no enriquecimento da parede celular pela formação de ligações cruzadas entre proteínas e compostos fenólicos e na deposição

de calose. CPKs e cascatas de MAP quinases também exercem ação regulatória sobre fatores de transcrição, como proteínas da família de fatores de transcrição WRKY, relacionados à expressão de genes de defesa vegetal, como, por exemplo, genes que codificam proteínas responsáveis pela biossíntese de compostos antimicrobianos e genes responsáveis pela biossíntese e percepção dos fitormônios ácido salicílico (AS) e etileno (ET) (BI et al., 2018; BIGEARD; COLCOMBET; HIRT, 2015; KADOTA et al., 2014; LAL et al., 2018; SOARES-SILVA et al., 2016; THOR et al., 2020).

1.5.2 Imunidade vegetal desencadeada por efetores (ETI)

As proteínas responsáveis pela percepção de efetores são denominadas NLRs (do inglês “nucleotide-binding leucine-rich repeat receptors”), as quais se localizam no citosol e são codificadas por genes da família NBS-LRR (do inglês “nucleotide-binding site; leucine rich repeats”), também denominados genes R (COLLIER; MOFFETT, 2009). Estas proteínas podem ser divididas em duas subclasses, de acordo com o domínio N-terminal: (i) NBS-LRR-TIR ou TLN, as quais contêm o domínio TIR (do inglês “Toll/Interleukin-1 receptors”); e (ii) NBS-LRR-CC ou CNL, contendo o domínio CC (do inglês “coiled coil”) (WU; SHAN; HE, 2014).

De modo geral, efetores são moléculas secretadas por patógenos que reprogramam as células do hospedeiro, com o objetivo de evadir ou suprimir o processo de PTI (JONES; DANGL, 2006). Dentre os efetores reconhecidos por NLRs, podem ser citados o efector AvrPto, secretado pela bactéria *Pseudomonas syringae*, o qual atua sobre a PTI pela inibição de quinases do hospedeiro (XIANG et al., 2008); AvrFom2, secretado por *Fusarium oxysporum*, o qual é reconhecido pela NLR CmFom-2 (em pepino, *Cucumis melo*) (SCHMIDT et al., 2016) e Avr1k e Avr1b-1, secretados por *Phytophthora sojae*, e reconhecidos pela NLR GmRps1-k (SONG et al., 2013; SUN et al., 2021).

O reconhecimento de efetores por NLRs pode ser direto, no qual ocorre interação física entre o efector e a proteína NLR (LIU et al., 2011; VAN DER HOORN; KAMOUN, 2008), ou indireto, predominando dois diferentes modelos de reconhecimento: (i) NLRs detectam alterações causadas pelo efector sobre uma molécula “guarda”, como ocorre com a proteína RIN4, a qual é alvo de efetores com atividade proteolítica e sua clivagem é detectada por NLRs em *A. thaliana*; e (ii) NLRs detectam alterações causadas em proteínas específicas, que mimetizam o alvo

verdadeiro de efetores (VAN DER HOORN; KAMOUN, 2008). A maioria das NLRs necessita da interação com outras NLRs (denominadas NLRs auxiliares) para a transdução do sinal imune, enquanto algumas são capazes de reconhecer os efetores (direta ou indiretamente) e mediar respostas imunes por si só (ADACHI; DEREVNINA; KAMOUN, 2019; SAILE et al., 2020). De modo geral, a partir do reconhecimento do efector, ocorre um processo de oligomerização de complexos formados entre as NLRs, efetores (ou proteínas alteradas por efetores) e proteínas NLR auxiliares (se necessárias) em complexos maiores denominados resistossomas, os quais são localizados na membrana plasmática ou em sua proximidade. No caso de ZAR1, uma NLR que não requer a associação com NLRs auxiliares, os resistossomas pentaméricos, obtidos a partir da oligomerização do complexo proteico formado por ZAR1 e as pseudoquinases RKS1 e PBL2 (uridilada pelo efector AvrAc, secretado por *Xanthomonas campestris*), apresentam atividade de canal catiônico, o que permite o influxo de cálcio no citosol, a ativação de CPKs e a consequente regulação de componentes de sinalização a jusante, como NADPH oxidases e fatores de transcrição relacionados à defesa vegetal, além de resultar em perturbações na estrutura de cloroplastos e vacúolos, perda de integridade da membrana plasmática e ruptura celular (BI et al., 2021; GAO et al., 2013; SUN et al., 2021; WANG et al., 2019). No caso de NLRs sensoras que necessitam da atuação de NLRs auxiliares para a transdução de sinal, domínios específicos são capazes de formar moléculas de sinalização, como nucleotídeos cíclicos 2',3'-cAMP/cGMP, os quais, possivelmente, estão relacionados com a regulação de componentes de sinalização a jusante (MA et al., 2020b; YU et al., 2022). Proteínas EP, as quais contêm o domínio EP em sua estrutura, como, por exemplo, SAG101, EDS1 e PAD4 também participam da via de transdução de sinais de NLRs, participando da indução da expressão de genes relacionados à defesa vegetal e da indução do processo de resposta hipersensível (HR, do inglês "hypersensitive response") (SUN et al., 2021). Deste modo, a percepção de efetores secretados por NLRs é responsável pela ativação do processo de ETI (JONES; DANGL, 2006), cuja sinalização envolve a alteração da concentração intracelular de cálcio, a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), a modulação dos fitormônios ácido salicílico (AS) e ácido jasmônico (JA) (RYAN et al., 1995) e o acúmulo de proteínas PR (GURURANI et al., 2012; HUNT; HANDOO, 2009; KARAJEH, 2008). O processo de ETI também pode resultar no estabelecimento de resposta de hipersensibilidade, a

qual compreende a morte celular programada de células infectadas, e de resistência sistêmica adquirida (RSA), responsável por conferir resistência persistente e de amplo espectro a subsequentes infecções por toda a planta, através do transporte de moléculas sinalizadoras como AS, metil-AS, auxina, óxido nítrico e EROs (NGOU et al., 2021).

1.5.3 Nematoides do gênero *Meloidogyne*

Nematoides das galhas (RKNs, do inglês “root knot nematodes”) pertencem ao gênero *Meloidogyne* e constituem extenso e onipresente grupo de animais habitantes do solo que parasitam vegetais, sendo responsáveis por representativo prejuízo econômico anual graças a danos decorrentes de sua infecção sobre culturas agrícolas (HUNT; HANDOO, 2009; KARAJEH, 2008). RKNs são endoparasitas sedentários, penetrando em tecidos do hospedeiro, durante as fases juvenis infectivas, e estimulando a formação de sítio especializado de alimentação, o qual proporcionará nutrição para o seu desenvolvimento, crescimento e reprodução (Figura 4). Dentre os membros deste grupo, encontram-se as espécies mais estudadas de nematoides fitoparasitas, incluindo *M. javanica*, *M. incognita*, *M. hapla* e *M. arenaria* (FAVERY et al., 2016; JONES et al., 2013; SMITH et al., 2018).



Figura 4: Presença de galhas em raízes de plantas de amendoim, sintoma característico de infecção por *Meloidogyne arenaria*. Fonte da imagem: <https://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5442267>.

Dependendo da espécie considerada e das condições ambientais prevalentes, o ciclo de vida de RKNs tem duração de três a seis semanas, compreendendo quatro estágios juvenis e o

estágio adulto (machos móveis ou fêmeas sedentárias), os quais são separados por mudas. A eclosão de ovos presentes no solo dá origem a formas juvenis J2 infectivas, as quais penetram as raízes na zona de alongação e migram em direção a células do cilindro vascular, através do apoplasto, sem causar danos maiores aos tecidos radiculares durante a migração. Quando atingem a zona de desenvolvimento do protoxilema, induzem a formação dos sítios de alimentação permanentes, a partir de injeções realizadas com o estilete em algumas células, e tornam-se sedentários. Estes sítios de alimentação são denominados células gigantes e resultam de sucessivas divisões nucleares sem a ocorrência de citocinese, sendo induzidas por secreções provenientes de células da glândula esofágica dos nematoides. Concomitantemente à formação de células gigantes, a hiperplasia e hipertrofia das células corticais adjacentes leva à formação de galhas, que representam o sinal primário da infecção de raízes de plantas suscetíveis por RKNs. Em seguida, as formas J2 sofrem três mudas para atingir o estágio adulto, no qual as fêmeas permanecem sedentárias e, posteriormente, dão origem a uma massa de ovos envoltos por massa gelatinosa, enquanto os machos se tornam vermiformes e móveis novamente (ABAD et al., 2003; TEILLET et al., 2013).

Dentre as estratégias para o controle de nematoides da galha em cultivos agrícolas, podem ser citadas: (i) práticas culturais como rotação de culturas e utilização de culturas de cobertura, as quais são regularmente aplicadas para reduzir populações de nematoides presentes, além de técnicas com uso mais restrito como solarização e inundação (CHEN; TSAY, 2006; FERRIS et al., 2012; NAVARRETE et al., 2016); (ii) controle químico com fumigantes de solo (DESAEGER; DICKSON; LOCASCIO, 2017); (iii) produtos naturais derivados de plantas (MEYER et al., 2015; SU et al., 2015); (iv) controle biológico, incluindo bactérias e fungos (TRANIER et al., 2014; ZENG et al., 2013) e (v) controle genético, incluindo o desenvolvimento de novas variedades por melhoramento genético (clássico ou assistido por marcadores moleculares) e por engenharia genética (transgenia, silenciamento gênico e edição gênica) (BARBARY et al., 2015; LEONETTI et al., 2018; TRIPATHI et al., 2015).

1.5.4 Interação molecular planta-nematoide

A percepção inicial de nematoides por plantas envolve padrões moleculares associados a

nematoides (NAMPs, do inglês “nematode-associated molecular patterns”), padrões moleculares associados a danos (DAMPs, do inglês “damage-associated molecular patterns”) e componentes de sinalização relacionados ao processo de PTI, como PRRs, correceptores e proteínas de sinalização a jusante (Figura 5) (MENDY et al., 2017; TEIXEIRA; WEI; KALOSHIAN, 2016). Dentre as moléculas classificadas como NAMPs, destacam-se os ascarosídeos, glicolipídios que atuam como feromônios e sinais de agregação e repulsão entre nematoides e que são encontrados em diversas espécies de nematoides (parasitas e de vida livre) (CHOE et al., 2012). A aplicação exógena de ascarosídeos foi capaz de elicitar respostas de defesa pertencentes à via da PTI em plantas, embora o específico receptor deste padrão molecular ainda não foi identificado (MANOSALVA et al., 2015). Secreções extracelulares compostas por glicoproteínas e a quitina constituinte de ovos e de paredes do lúmen esofágico de RKNs podem constituir fontes adicionais de NAMPs (HOLBEIN; GRUNDLER; SIDDIQUE, 2016).

Dentre os componentes de sinalização relacionados ao processo de PTI induzido pela infecção de tecidos radiculares por nematoides, incluem-se a PRR NILR1, a RLK BIK1, o correceptor BAK1/SERK3 e as NADPH oxidases RbohD/F (MENDY et al., 2017; TEIXEIRA; WEI; KALOSHIAN, 2016).

No que diz respeito à via de sinalização relacionada ao processo de ETI, diversos efetores secretados por RKNs foram identificados, incluindo MiMsp40 e Mi8D05, os quais atuam através da supressão de respostas de defesa relacionadas aos processos de PTI e ETI (NIU et al., 2016; XUE et al., 2013); o peptídeo 16D10, o qual interage com fatores de transcrição da família SCL (do inglês “SCARECROW-like transcription factors”) e altera o padrão de crescimento de tecidos radiculares (HUANG et al., 2006) e o efector MiSGCR1, o qual reprime o processo de morte celular programada induzida pela resposta de hipersensibilidade (NGUYEN et al., 2018). Dentre os principais genes de resistência contra RKN, destacam-se os genes Mi-1, o qual codifica proteína NBS-LRR-CC, e Ma, o qual codifica proteína NBS-LRR-TIR (CLAVERIE et al., 2011; MILLIGAN et al., 1998). A proteína Mi-1 confere resistência contra três espécies de RKNs, não possui efector claramente identificado e seu mecanismo de resistência envolve desde alterações na formação de sítios de alimentação, como a repressão da iniciação e necrose posterior à formação da célula

gigante, até a indução de resposta de hipersensibilidade. A proteína Ma confere resistência contra 30 espécies de RKN, não possui efetor identificado e seu mecanismo de resistência envolve a indução de resposta de hipersensibilidade (KALOSHIAN; DESMOND; ATAMIAN, 2011; SAUCET et al., 2016).

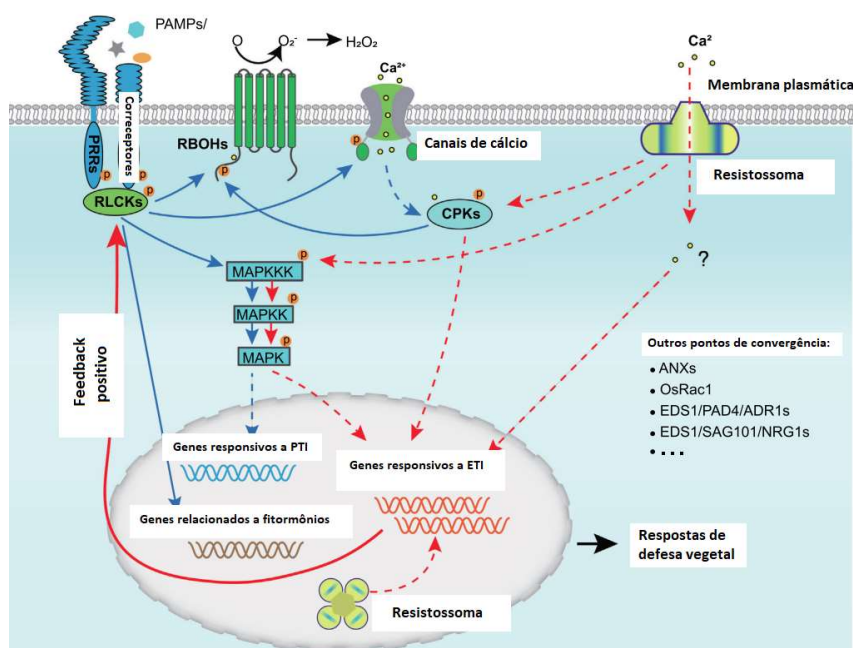


Figura 5: Esquema ilustrativo dos processos de PTI e ETI, juntamente com os componentes das respectivas vias de transdução de sinal e genes regulados, com destaque para interações e pontos de convergência entre os 2 processos. Imagem adaptada de Yuan et al., 2021

1.6 RNAs não codificantes (ncRNAs)

Moléculas de RNA (ácido ribonucleico) sempre ocuparam papel de destaque no campo da biologia e genética molecular, constituindo, possivelmente, a maquinaria celular dos primeiros organismos vivos (HIGGS; LEHMAN, 2014). Por muito tempo, o aspecto funcional destas moléculas esteve sempre acoplado ao conceito geral do dogma central da biologia molecular, através da intermediação do processo de expressão gênica como moldes para a formação de proteínas (RNA mensageiro – mRNA) e da participação do processo de tradução como componentes estruturais dos ribossomos (RNA ribossomal – rRNA) e como adaptadores moleculares responsáveis pelo transporte de aminoácidos aos sítios de síntese de proteínas (RNA

transportador – tRNA) (BRENNER; JACOB; MESELSON, 1961; HOAGLAND et al., 1958; PALADE, 1955).

A descoberta de novas classes de RNAs, portadoras de funcionalidades relacionadas a complexos processos celulares de organismos eucariontes, como o *splicing* (RNAs nucleares pequenos - snRNA), a metilação e pós-processamento das demais classes de RNAs (RNAs nucleolares pequenos - snoRNA), ampliou a compreensão sobre o amplo espectro de ação destas moléculas no âmbito do funcionamento celular (BUTCHER; BROW, 2005; MAXWELL; FOURNIER, 2003; WEINBERG; PENMAN, 1968). No entanto, ainda predominava a ideia convencionada pelo dogma central, na qual a principal via regulatória da expressão gênica era composta por fatores de transcrição e, de um modo geral, RNAs inseriam-se nesta concepção.

No final da década de 80 e início da década de 90, a constatação da supressão de determinados genes pela expressão de cDNAs antisense e a observação do fenômeno de cossupressão em plantas e RNAi em animais, no qual a expressão de um transgene impactava a expressão de um gene homólogo endógeno, indicavam a existência de mecanismos regulatórios alternativos, cuja mecânica ainda não estava elucidada (GUO; KEMPHUES, 1995; MATZKE et al., 1989; NAPOLI; LEMIEUX; JORGENSEN, 1990; VAN DER KROL et al., 1990). Em 1993, a classe de RNAs não-codificantes denominada microRNA (miRNA) foi descoberta em *Caenorhabditis elegans*, com a identificação do locus *lin-4*, o qual não era responsável pela formação de proteínas, e a demonstração de seu papel regulatório através da parcial complementaridade de seus transcritos com o gene *lin-14* (LEE; FEINBAUM; AMBROST, 1993).

Em 1994, a classe de RNAs não-codificantes denominada RNA pequeno interferente heterocromático (hc-siRNA, do inglês *heterochromatic small interfering RNA*) foi identificada através da constatação da completa metilação de sequências pertencentes a viroides, as quais foram introduzidas por transformação via *Agrobacterium tumefaciens* em células do tecido foliar de plantas de tabaco. O mecanismo responsável pela metilação de sequências genômicas guiadas por moléculas de ácido ribonucleico foi denominado metilação de DNA guiada por RNA (RdDM, do inglês *RNA directed DNA Methylation*) (WASSENEGGER et al., 1994).

Os mecanismos moleculares responsáveis pelo processo de RNAi em plantas e animais

começaram a ser elucidados a partir de 1998, quando foi demonstrado que a utilização de construções genéticas com auto-complementaridade, capazes de formar um duplex de RNA, regulavam a expressão de genes alvo via hibridização (FIRE et al., 1998; WATERHOUSE; GRAHAM; WANG, 1998). No início da primeira década do século XXI, foram identificados componentes do mecanismo de RNAi (BERNSTEIN et al., 2001; DOI et al., 2003) , como as proteínas Dicer e AGO, e novas classes de RNAs não codificantes, como os pequenos RNAs interferentes em trans (ta-siRNA, do inglês *trans-acting small interfering RNA*), os quais são gerados a partir da ação de outros pequenos RNAs não-codificantes, e os pequenos RNAs interferentes naturais antisense (nat-siRNA, do inglês *natural antisense small interfering RNA*), os quais derivam da hibridização de transcritos naturalmente gerados no genoma (BORSANI et al., 2005; VAZQUEZ et al., 2004).

Em função da similaridade entre os seus mecanismos regulatórios e ao característico tamanho reduzido das moléculas de RNA geradas, as quais são ulteriormente responsáveis pela regulação transcricional e pós-transcricional, as diferentes classes descritas foram agrupadas em um supergrupo denominado pequenos RNAs (sRNAs, do inglês *small RNAs*). Além das classes de sRNAs mencionadas, outras classes foram descritas em diferentes organismos eucariontes, como (i) os RNAs que interagem com proteínas PIWI (piRNAs, do inglês *PIWI-interacting RNAs*) presentes em animais, com tamanho entre 21-35 nucleotídeos, os quais estão relacionados ao silenciamento de transposons, regulação da expressão gênica e combate a infecções virais (Ozata et al., 2018), (ii) sRNAs derivados de snoRNAs (TAFT et al., 2009), (iii) fragmentos de tRNAs associados a proteínas AGO (HAUSSECKER et al., 2010) e (iv) sRNAs encontrados somente em animais, com tamanho entre 17-18 nucleotídeos, associados a diferentes sítios genômicos (sítios de início da transcrição, sítios de splice e promotores), os quais parecem estar relacionados à organização estrutural da cromatina e ao processo de silenciamento transcricional direcionado por RNAs (HAN; KIM; MORRIS, 2007; TAFT et al., 2010, 2011).

É importante destacar que pequenos RNAs com ação regulatória também estão presentes em organismos procariontes, e estão relacionados a respostas adaptativas por meio de diferentes mecanismos, como (i) hibridização antisense com RNAs alvo (GOTTESMAN, 2005), (ii) ligação alostérica a metabólitos (riboswitches) (WINKLER, 2005), e (iii) clivagem de moléculas de

DNA e RNA de origem viral (mecanismo CRISPR-Cas) (BARRANGOU et al., 2007; HALE et al., 2009).

O desenvolvimento de tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês Next Generation Sequencing) e sua aplicação ao estudo do transcrito de organismos eucariontes demonstraram que grande parte do genoma destes organismos é transcrito e que a maioria destes transcritos não codificam proteínas, sendo classificados como RNAs longos não codificantes (lncRNAs, do inglês *long non-coding RNAs*) (MERCER et al., 2011; TAFT; PHEASANT; MATTICK, 2007). Apesar da reduzida conservação evolutiva e baixos níveis de expressão de membros pertencentes a esta classe, o que gerou questionamentos sobre a sua funcionalidade biológica (PALAZZO; LEE, 2015), a constatação de conservação estrutural (JOHNSSON et al., 2014), presença de características típicas de genes (como conservação de promotores e expressão regulada por conformação estrutural da cromatina e interação com fatores de transcrição) (MATTICK, 2009), expressão diferencial em diferentes tipos celulares (MERCER et al., 2008) e em resposta a diferentes condições extracelulares (Xin et al., 2011), além da ocorrência de splicing alternativo (JOHNSSON et al., 2013), são indicativos da importância funcional e participação desta classe de moléculas em complexos mecanismos regulatórios presentes em organismos eucariontes. Este grupo de RNAs é constituído por transcritos compostos por mais de 200 nucleotídeos, originários da transcrição de regiões intergênicas, introns e fitas opostas de genes que codificam proteínas (ARIEL et al., 2015). Em plantas, lncRNAs desempenham papel fundamental em diferentes processos celulares e fisiológicos, como a regulação do florescimento, silenciamento de genes, organogênese do sistema radicular e fotomorfogênese de plântulas (ARIEL et al., 2015; CHEKANOVA, 2015).

Deste modo, RNAs não-codificantes podem ser classificados, de acordo com a sua função, em RNAs não-codificantes estruturais, compreendendo RNAs ribossomais (rRNA), RNAs transportadores (tRNAs), pequenos RNAs nucleares (snRNAs) e pequenos RNAs nucleolares (snoRNAs), e RNAs não-codificantes regulatórios, englobando, principalmente, pequenos RNAs não-codificantes (sRNAs) e RNAs longos não-codificantes (lncRNAs) (Figura 6).

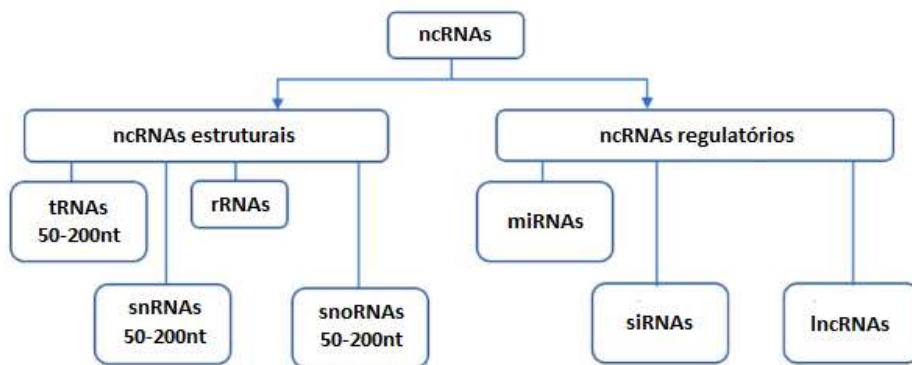


Figura 6: Diferentes grupos de RNAs não codificantes (ncRNAs estruturais e ncRNAs regulatórios) e seus respectivos subgrupos. Imagem adaptada de Waititu et al., 2020. (Bhogireddy et al., 2021).

1.6.1 sRNAs (small RNAs) em plantas

O grupo dos pequenos RNAs não codificantes (sRNAs) originou-se de mecanismos celulares de defesa contra ácidos nucleicos exógenos (como, por exemplo, vírus) e elementos transponíveis e, posteriormente, englobou a regulação de diversos processos celulares relacionados ao desenvolvimento, reprodução e reprogramação genética (BORGES; MARTIENSSEN, 2015). Em plantas, sRNAs podem ser classificados em dois principais grupos, de acordo com as características da molécula de RNA precursora: (i) os RNAs hairpin (hpRNA, do inglês hairpin RNA), derivados de precursores de fita simples com estrutura hairpin intramolecular formada por auto-complementaridade e (ii) os pequenos RNAs interferentes (siRNAs), cujo precursor é uma molécula de RNA de fita dupla, formada pela reação de polimerização catalisada por proteínas RDR (RNA-DEPENDENT POLYMERASES) ou pela hibridização entre dois transcritos endógenos. O grupo dos siRNAs ainda pode ser subdividido em três subgrupos: (i) pequenos RNAs interferentes heterocromáticos (hc-siRNAs), (ii) pequenos RNAs interferentes secundários e (iii) pequenos RNAs interferentes antisense naturais (nat-siRNAs) (AXTELL, 2013; BHOGIREDDY et al., 2021).

De um modo geral, sRNAs são obtidos a partir da ação endonucleolítica de proteínas DCL (Dicer-like) sobre determinadas regiões de precursores hairpin de fita simples ou precursores de fita dupla, o que resulta em duplex de RNA compostos por fitas de 20-24 nucleotídeos. Uma das

fitas do duplex é carregada em proteínas da família argonauta (AGO), o que, juntamente com outras proteínas, irá compor o complexo proteico RISC (do inglês RNA-Inducing Silencing Complex), o qual será responsável pela atividade direta ou indireta de repressão do gene alvo. Esta repressão poderá ocorrer através de modificações a nível de cromatina (silenciamento transcricional), redução da estabilidade de moléculas de RNA mensageiro ou redução da eficiência traducional (silenciamento pós-transcricional) (AXTELL, 2013; BORGES; MARTIENSSEN, 2015). O mecanismo evolutivo de duplicação e divergência de genes responsáveis pela formação de DCLs, RDRs e AGOs foi responsável pelo surgimento de diferentes tipos de pequenos RNAs e pela diversificação de mecanismos regulatórios de silenciamento (MUKHERJEE; CAMPOS; KOLACZKOWSKI, 2013; WILLMANN et al., 2011).

O grupo dos hc-siRNAs é derivado, principalmente, de transposons e elementos repetitivos e seus componentes possuem, em sua maioria, 24 nucleotídeos (AXTELL, 2013). O seu processo de biogênese envolve a transcrição de precursores com 26-45 nucleotídeos de tamanho pela RNA Polimerase Dependente de DNA PolIV, os quais são convertidos em fita dupla através do processo de polimerização realizado pela enzima RDR2 e, posteriormente, processados em duplex de 24 nucleotídeos pela DCL3. Após a fase inicial de processamento, a qual ocorre no núcleo, o duplex formado é transportado ao citoplasma, onde ocorre o carregamento da fita principal na proteína AGO4, e o complexo formado é subsequentemente transportado de volta ao núcleo (DAXINGER et al., 2009). Os componentes deste grupo estão relacionados com a reversível deposição de novo de modificações repressivas cromatina em regiões eucromáticas, através do processo de Metilação do DNA Dependente de RNA (RdDM, do inglês RNA-dependent DNA Methylation), o qual envolve a interação entre o complexo siRNA-AGO4 e transcritos gerados pela RNA Polimerase dependente de DNA PolV e o subsequente recrutamento da proteína DRM2 (MATZKE; MOSHER, 2014). Em diversas espécies de plantas fanerógamas, a classe de hc-siRNAs é a mais abundante em experimentos de sequenciamento de sRNAs (AXTELL, 2013).

Pequenos RNAs interferentes secundários derivam de moléculas precursoras de RNA de fita dupla geradas pela ação de um sRNA (geralmente um miRNA ou outra espécie de siRNA secundário) sobre um transcrito primário a montante, o qual pode ser originário de um gene

capaz de codificar proteínas ou pode ser uma espécie de RNA longo não codificante (lncRNA). Este grupo ainda pode ser subdividido em pequenos RNAs interferentes em fase (phasRNA, do inglês phased small-interfering RNA), formados a partir do sucessivo processamento da molécula resultante da clivagem inicial pela endonuclease DCL4; e em pequenos RNAs interferentes em trans (tasiRNA, do inglês trans-acting small-interfering RNA), os quais atuam em loci diferentes do locus originário (em trans). É importante ressaltar que esta classificação terciária não é mutuamente exclusiva (podem existir siRNAs secundários gerados em fase com atuação em trans), assim como não é absoluta (tasiRNA e phasRNA constituem um subconjunto do total de siRNAs secundários gerados em uma célula vegetal) (AXTELL, 2013). De modo geral, miRNAs com 22 nucleotídeos carregados na proteína AGO1 ou siRNAs carregados em proteínas AGO7 ou AGO2 clivam um transcrito primário, com subsequente recrutamento da proteína RDR6, a qual é responsável pela formação de uma molécula de RNA precursora de fita dupla, posteriormente, processada pela proteína DCL4 em siRNAs de 21-22 nucleotídeos (ALLEN et al., 2005; YOSHIKAWA et al., 2005). Diversos módulos miRNA/genes-alvo e componentes do grupo de siRNAs foram identificados e associados com a regulação de diferentes vias metabólicas vegetais e processos de adaptação a condições exógenas bióticas e abióticas (LI et al., 2014; LUO et al., 2012; MARIN et al., 2010; SHIVAPRASAD et al., 2012).

O terceiro grupo de siRNAs compreende os pequenos RNAs interferentes natural antisense (nat-siRNA, do inglês natural antisense small-interfering RNAs), os quais, por definição, derivam da hibridização de moléculas de RNA complementares transcritas separadamente (AXTELL, 2013). A definição desta classe sugere a independência de proteínas da família RDR para a geração dos precursores de fita dupla, o que a diferenciaria das demais classes de siRNA. No entanto, a maioria dos componentes deste grupo que foram investigados apresentam acúmulo dependente de proteínas RDR, o que indica a possibilidade de mecanismos de biogênese alternativos (ZHANG et al., 2012).

1.6.2 MicroRNAs em plantas

MicroRNAs (miRNAs) em plantas constituem um subgrupo de pequenos RNAs não-

codificantes com ação regulatória, com tamanho entre 20-24 nucleotídeos (embora a maioria dos miRNAs seja composta por espécies com 20-22 nt), cuja biogênese envolve a atuação de diversas proteínas, com destaque para as proteínas do clado Dicer-like 1 (DCL1) e sua ação sobre moléculas alvo depende de seu carregamento, principalmente, em proteínas Argonauta 1 (AGO1) (QIN et al., 2014).

A existência de proteínas da família Argonauta e proteínas da família Dicer e Dicer-like, juntamente com a capacidade de promover o silenciamento gênico mediante a formação de siRNAs provenientes do processamento de dsRNAs (processo de RNAi – considerado como mecanismo de defesa contra elementos repetitivos endógenos e fatores exógenos, como vírus e ácidos nucleicos) é comum em diferentes linhagens eucarióticas, o que indica o seu surgimento no início do processo evolutivo destes organismos. Por outro lado, a maior restrição filogenética da ocorrência de miRNAs e as semelhanças entre o funcionamento, estrutura e mecanismo de biogênese desta classe de sRNAs com siRNAs sugerem tanto a descendência de um sistema de silenciamento gênico comum e ancestral baseado em sRNAs como o provável advento de miRNAs como uma inovação mais recente na evolução destes organismos, responsável pela regulação e integração de diferentes vias de sinalização relacionadas a diversos processos biológicos essenciais e adaptativos (AXTELL; BOWMAN, 2008; MORAN et al., 2017).

Em organismos vegetais existem dois principais grupos de miRNAs: (i) o grupo dos miRNAs conservados (ou ancestrais), composto por famílias de miRNAs, cujos membros podem ser encontrados em organismos pertencentes a diferentes linhagens do reino vegetal, e (ii) o grupo dos miRNAs não-conservados, composto por miRNAs encontrados em algumas espécies pertencentes a uma determinada linhagem ou apenas em determinada espécie. Em geral, existem diversos loci responsáveis pela formação de miRNAs conservados em genomas de espécies vegetais, os quais apresentam elevados níveis de expressão, elevada homologia de seus alvos entre diferentes linhagens que constituem, geralmente, fatores de transcrição ou enzimas relacionadas a processos essenciais do desenvolvimento de plantas. Com relação ao grupo dos miRNAs não-conservados, de modo geral, possuem apenas um locus responsável por sua formação em genomas vegetais, com baixo nível de expressão (muitas vezes restrito a

determinados tipos celulares ou fases do desenvolvimento) e podem ou não apresentar moléculas-alvo sobre as quais exercem ação regulatória. Através da utilização de tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) para identificação e análise de famílias de miRNAs em *A. thaliana*, foi possível constatar o maior número de famílias de miRNAs não conservadas em relação ao número de famílias de miRNAs conservadas e a extensão da similaridade entre as sequências dos miRNAs e as sequências dos genes-alvo para regiões além dos sítios de ligação (englobando regiões do transcrito primário de miRNA – pri-miRNA), o que indica o recente surgimento destas famílias em termos evolutivos. A elevada similaridade com genes-alvo sustenta o principal modelo de surgimento e evolução de miRNAs em plantas, a partir do qual duplicações de sequências invertidas de genes e subsequentes mutações são responsáveis pela evolução de novas espécies de miRNAs, as quais estão sujeitas a elevadas pressões de seleção, nas quais somente interações benéficas são selecionadas e se sustentam ao longo do processo evolutivo.

1.6.3 Anotação de miRNAs em plantas

A primeira iniciativa para a formalização de padrões utilizados para a anotação de miRNAs em plantas foi realizada em 2003 (AMBROS et al., 2003), a qual também incluiu regras para a nomenclatura desta classe de sRNAs. Neste trabalho, os autores citam a clonagem de sequências de cDNA obtidas a partir de amostras de RNA fracionadas por tamanho como o principal método para descoberta de novas espécies de miRNAs e ressalta dificuldades relacionadas à contaminação de amostras com outros tipos de RNAs não codificantes e à diferenciação entre miRNAs e siRNAs. Os critérios estabelecidos para a caracterização de sRNAs como bona fide miRNAs estavam sustentados em 2 principais pilares: (i) detecção da expressão (por meio do acúmulo das espécies em, principalmente, experimentos de Northern Blot ou pela detecção em bibliotecas de cDNAs expressos) e (ii) confirmação do processo de biogênese (por meio da predição do precursor de fita simples com adequada estrutura secundária, da constatação de conservação filogenética do miRNA maduro e da molécula precursora predita e da observação de incremento do acúmulo da molécula precursora em mutantes com reduzida função de proteínas da família Dicer) (AMBROS et al., 2003).

Embora esta primeira iniciativa tenha sido muito importante para o estabelecimento de bases iniciais para a anotação de miRNAs, o aumento da compreensão sobre pequenos RNAs regulatórios em organismos vegetais, juntamente com o advento de tecnologias de sequenciamento de nova geração e sua aplicação ao estudo de sRNAs em plantas, elucidaram diversas limitações dos critérios inicialmente adotados, assim como tornaram necessária a sua atualização para aumentar a qualidade e precisão das anotações (MEYERS et al., 2008). Dentre as limitações desta primeira iniciativa, o critério de detecção da expressão baseado, principalmente, em experimentos de Northern Blot, não seria capaz de diferenciar miRNAs e siRNAs (presentes, de maneira geral, em quantidade e diversidade muito maior que miRNAs em pools de RNAs com tamanho reduzido); o critério da conservação se mostrou inadequado, uma vez que muitas famílias de miRNAs não são conservadas em diferentes linhagens filogenéticas; e a observação de impactos no acúmulo do miRNA putativo em linhagens mutantes com reduzida função de proteínas Dicer também se mostrou inadequado, na medida em que, de modo geral, organismos vegetais expressam diversas proteínas da família Dicer-like, as quais possuem ação redundante e que podem estar relacionadas tanto a miRNAs como a espécies de siRNAs.

Deste modo, em 2008, foi publicada uma revisão dos critérios iniciais que buscou englobar o novo conhecimento acumulado, assim como adequar os critérios à nova realidade do estudo de sRNAs por meio de experimentos de sequenciamento profundo (sRNA-seq) (MEYERS et al., 2008). Este trabalho sugeriu a constatação da precisa excisão de um duplex miRNA/miRNA* (com tamanho aproximado de 21 nucleotídeos) a partir de molécula precursora de RNA de fita simples com estrutura secundária na forma de 'hairpin' como critério primário, único e necessário para a anotação de espécies de sRNA como miRNAs. Pela primeira vez, foram determinadas características estruturais que deveriam ser obedecidas por putativos precursores de fita simples e sRNAs identificados, como: localização do miRNA e miRNA* em braços opostos do precursor, formando um duplex com saliência (overhang) de 2 nucleotídeos nas extremidades 3' de cada fita; extenso pareamento entre os braços do precursor, com, no máximo, quatro mismatches; e bulges minimamente assimétricos em tamanho e frequência. Além da estrutura da molécula precursora putativa, o critério primário incluía a exigência de que, no mínimo, 75%

das leituras alinhadas ao locus MIR putativo deveriam ser constituídos pela sequência exata do miRNA maduro ou do miRNA*, o que levaria em conta a ocorrência de leituras com alterações de tamanho ou alterações posicionais em bibliotecas de sRNAs. Os autores também incluíram critérios auxiliares, os quais, não eram necessários para a anotação de miRNAs e, por si só, eram insuficientes para adequada anotação, porém, poderiam complementar e reforçar o critério primário em situações específicas. Dentre estes critérios, foram citados a conservação filogenética, a qual não é necessária para a anotação, mas contribui para a anotação de famílias conservadas quando constatada, a identificação de alvos, o que também não é necessário para a anotação, uma vez que muitos miRNAs possuem alvos de difícil identificação ou não possuem alvos (graças ao seu recente surgimento em genomas vegetais); dependência de proteínas da família DCL, o que não constitui critério adequado para anotação de miRNAs, tanto pela expressão de diversos genes da família DCL em plantas como pela associação de siRNAs com diferentes membros desta família de proteínas; independência de proteínas da família RDR e RNA Polimerases IV e V (PolIV e PolV), o que indicaria que a espécie de sRNA não estaria relacionada ao mecanismo de biogênese de siRNAs, porém, por si só, não seria suficiente para a anotação de miRNAs, caso o critério primário não fosse atendido; e localização em regiões repetitivas do genoma, o que deve ser considerado cuidadosamente, uma vez que, na maioria das vezes, está relacionado à formação de espécies de hc-siRNA.

Os critérios estabelecidos pela revisão de 2008 corrigiram diversos pontos relacionados à primeira iniciativa de 2003, estabelecendo bases sólidas para adequada análise de dados provenientes de experimentos de sRNA-seq e anotação de miRNAs, contribuindo para evitar a propagação de falsos positivos. Em 2018, uma nova atualização destes critérios foi publicada, ressaltando, mais uma vez, a urgente necessidade de minimização de falsos positivos no processo de anotação de miRNAs em espécies vegetais, através da definição de específicos padrões que devem ser adotados pela comunidade envolvida com esta linha de pesquisa. Os autores mantiveram o critério primário para anotação de miRNAs representado pela constatação de precisa excisão de duplex miRNA/miRNA* de precursor 'hairpin' predito por ferramentas computacionais, acrescentando e/ou alterando parâmetros relacionados ao duplex identificado,

a características do miRNA maduro predito, à estrutura da molécula precursora putativa e à replicabilidade dos dados obtidos. Com relação à estrutura do hairpin precursor predito, determinadas características são essenciais para eficiente reconhecimento e processamento por proteínas da família DCL e, portanto, devem estar presentes para adequada anotação, como a formação de um único duplex, a inexistência de estruturas como 'stems' secundários e 'loops' grandes (compostos por mais de cinco nucleotídeos) nas regiões que dão origem ao duplex, e tamanho da molécula precursora de, no máximo, 300 nucleotídeos. Com relação ao duplex identificado, para adequada anotação, até cinco posições com mismatches entre os pares de bases são aceitas, dentre as quais, no máximo, três podem conter bulges assimétricos. O parâmetro relacionado à precisão do processamento do precursor, calculado com base na porcentagem de leituras com sequência idêntica ao miRNA maduro e miRNA* previstos em relação ao total de leituras foi revisto pelos autores desta revisão, aonde a contagem de leituras passou a incluir também variantes posicionais e de tamanho de um nucleotídeo, mudança justificada pela constatação de elevada presença destas variantes em bibliotecas de sRNAs, provavelmente por uma combinação de clivagem de proteínas DCL em diferentes posições, modificações da extremidade 3' pós-clivagem e degradação da amostra. Outro parâmetro muito importante e efetivo para a minimização da anotação de falsos positivos é a definição do tamanho da molécula de sRNA mais adequado para a anotação como miRNA. Segundo os autores, moléculas com tamanho menor que 20 nucleotídeos e maior que 24 nucleotídeos não devem ser anotadas como miRNAs e moléculas com tamanho entre 23 e 24 nucleotídeos devem ser tratadas com cautela, uma vez que moléculas de miRNA destes tamanhos são muito raras (embora existam), de modo que a maioria dos miRNAs anotados possuem tamanho entre 20-22 nucleotídeos. Além dos parâmetros acima citados, os autores destacam a importância da reprodutibilidade dos dados em bibliotecas independentes de sRNA para dar sustentação à anotação (AXTELL; MEYERS, 2018). Dois exemplos, um de uma estrutura adequada e outro de uma estrutura inadequada podem ser vistas na Figura 7.

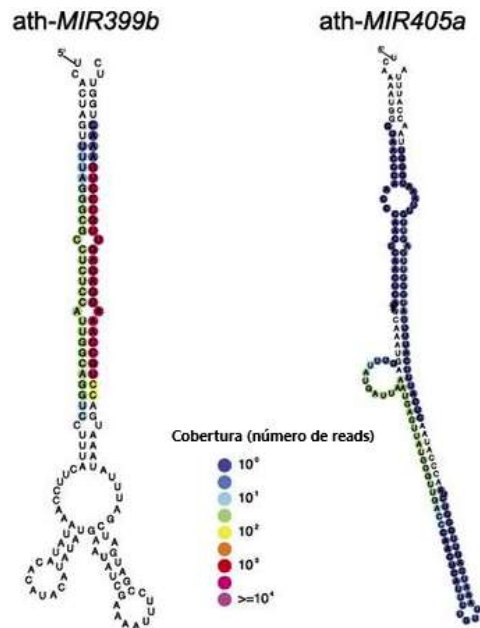


Figura 7: Exemplos de miRNA válido (à esquerda) e inválido de acordo com os critérios para anotação de miRNAs definidos na revisão de 2018. Imagem adaptada de Axtell & Meyers, 2018.

1.6.4 Biogênese dos miRNAs em plantas

O processo de biogênese de miRNAs tem início com a transcrição de genes MIR, os quais, na maioria das plantas, estão localizados em regiões intergênicas do genoma (Reinhart et al., 2002). De modo geral, estes genes constituem unidades transcricionais independentes e seu processo de transcrição é similar ao de genes que codificam proteínas (XIE et al., 2005). Genes MIR são transcritos pela proteína RNA polimerase II (PolII), cujo recrutamento aos sítios de ligação TATA box presentes na região de seu promotor é mediado pelo cofator Mediator e por diversos fatores de transcrição (ALLEN et al., 2005; KIM et al., 2011b; WANG; PERRY, 2013; YANT et al., 2010; YUMUL et al., 2013). Outras proteínas relacionadas com a regulação da transcrição de genes MIR incluem proteínas NOT2, as quais interagem com a região C-terminal da PolII e influenciam a transcrição destes genes em *A. thaliana*, e a proteína CDC5, cuja associação tanto com o promotor como com a polimerase PolII atuam sobre o recrutamento desta última para o sítio de transcrição (WANG; PERRY, 2013; ZHANG et al., 2013). O transcrito gerado, denominado miRNA primário (pri-miRNA, do inglês primary miRNA), através do pareamento intramolecular

imperfeito, forma uma estrutura de hairpin associada a extensões de fita simples de RNA em cada extremidade e, após a transcrição, é estabilizado pela adição de um cap de 7-metilguanósina na extremidade 5' e uma cauda poliadenilada na extremidade 3' (JONES-RHOADES; BARTEL, 2004; XIE et al., 2005).

Após a transcrição, pri-miRNAs são inicialmente processados por proteínas da família Dicer-like (DCL) em miRNAs precusores (pre-miRNA, do inglês precursor miRNA), os quais contêm a estrutura de hairpin com overhang de dois nucleotídeos na extremidade 3' de cada braço do hairpin. Subsequentemente, pre-miRNAs são novamente processados por proteínas da família DCL em um duplex composto pelo miRNA maduro (miRNA) e miRNA passageiro (miRNA*), contendo, em cada fita, um overhang de 2 nucleotídeos na extremidade 3' e um grupo fosfato na extremidade 5' (Figura 8) (MARGIS et al., 2006).

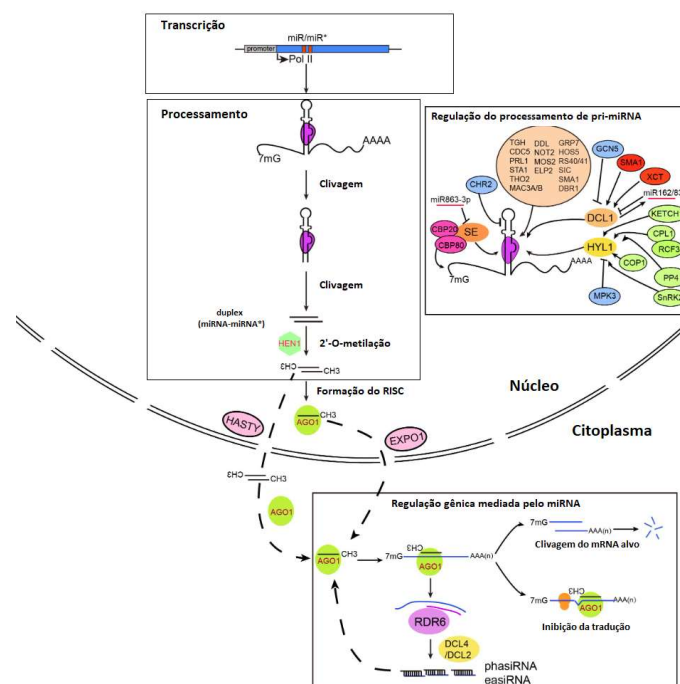


Figura 8: Esquema do processo de biogênese e regulação da expressão gênica realizada por miRNAs. Imagem adaptada de Wang et al., 2019.

A família de proteínas DCL é composta por 4 membros, cada qual sendo responsável pela formação de sRNAs de determinado tamanho. A proteína DCL1 é responsável pelo processamento da maioria dos genes MIR, mas foi demonstrado que a proteína DCL4 também é

capaz de gerar miRNAs, além da constatação de interação entre DCL1 e DCL3 para a formação de miRNAs de 24 nucleotídeos em arroz (RAJAGOPALAN et al., 2006; REINHART et al., 2002; WU et al., 2010; XIE et al., 2004). A eficiência e precisão da etapa de processamento envolve as proteínas serrate (SE), hyponastic leaves1 (HYL1) e tough (TGH), as quais, juntamente com as proteínas DCL, compõe um complexo proteico, cuja funcionalidade está relacionada a específicos loci subnucleares denominados corpos D (do inglês D-bodies) (FUJIOKA et al., 2007; HAN et al., 2004; REN et al., 2012; YANG et al., 2006). A correta localização destes loci é essencial para o processo de biogênese de miRNAs e foi demonstrado que as proteínas NOT2 e MOS2, as quais também são encontradas em corpos D, estão relacionadas e com a formação destes loci e recrutamento de pri-miRNAs aos mesmos (WANG; PERRY, 2013; ZHANG et al., 2013) . É importante notar a constatação da interação entre o complexo proteico Elongator e o complexo proteico Dicing (composto pela proteína DCL1 e demais proteínas complementares), o qual se mostrou necessário tanto para a adequada localização de proteínas DCL1 em corpos D como para a associação de pri-miRNAs e DCL1 com a cromatina de genes MIR, o que sugere o processamento cotranscricional de pri-miRNAs (FANG et al., 2015).

O duplex miRNA/miRNA* é estabilizado através da metilação 2'-O de nucleotídeos da extremidade 3' de cada fita, a qual é realizada pela metiltransferase HEN1 (YU et al., 2005). Esta etapa ocorre antes da dissociação do duplex e a sua ausência interfere no acúmulo de miRNAs, incrementando a quantidade de miRNAs truncados na extremidade 3' ou oligouridilados (LI et al., 2005; PARK et al., 2002; YANG et al., 2006). O duplex é posteriormente transportado para o citoplasma por meio das proteínas HST, homóloga à proteína exportin5 (MEE et al., 2005).

Proteínas pertencentes à família Argonauta (AGO) são componentes centrais do complexo proteico RNA Induced Silencing Complex (RISC) e atuam como efetores responsáveis por implementar o silenciamento gênico intermediado pela hibridização entre o miRNA maduro (associado a proteínas AGO) e a molécula de RNA alvo (AXTELL, 2013). Estas proteínas possuem quatro principais domínios funcionais, dentre os quais encontra-se o domínio PIWI, com estrutura similar a ribonucleases da família RNase H e responsável pela clivagem de moléculas alvo na posição oposta aos 10o e 11o nucleotídeos do miRNA maduro, embora nem todos os

membros desta família possuam atividade endonucleolítica (HUTVAGNER; SIMARD, 2008; TOLIA; JOSHUA-TOR, 2006). Em *A. thaliana*, dentre as 10 proteínas AGO codificadas (AGO1-10), de modo geral, AGO1 é a principal efetora para miRNAs, embora AGO7 e AGO10 também sejam capazes de associar com determinadas famílias de miRNAs ou exerçam funções específicas na regulação da atividade de miRNAs (JI et al., 2011; MI et al., 2008; MONTGOMERY et al., 2008; ZHU et al., 2011).

O duplex de miRNA/miRNA* formado na fase de processamento é carregado em proteínas AGO com a subsequente seleção da fita guia e desassociação do miRNA*, o qual é finalmente degradado pela maquinaria celular responsável pelo turnover de miRNAs (AXTELL, 2013). A etapa de seleção da fita guia está relacionada tanto com a estabilidade termodinâmica da extremidade 5' das fitas do duplex como com a ação das proteínas HYL1 e CPL1 (fosfatase responsável por manter a proteína HYL1 funcional por meio de sua hipofosforilação) (EAMENS et al., 2009; MANAVELLA et al., 2012). O processo de dissociação do miRNA* do RISC não envolve a ação endonucleolítica da AGO relacionada, mas parece ser regulado pelo desacoplamento das proteínas Hsp90 e SQN do complexo RISC, o que seria responsável por mudança conformacional da proteína AGO. A participação das proteínas Hsp90 e SQN no processo de dissociação do miRNA* indica a ocorrência do processo de carregamento das proteínas AGO no compartimento citoplasmático (CARBONELL et al., 2012; IKI et al., 2010, 2012).

1.6.5 Mecanismos de ação

A clivagem de moléculas de mRNA pela atividade endonucleolítica de proteínas AGO, guiada pela hibridização entre a molécula de miRNA maduro carregada no complexo RISC e o seu alvo, constitui a principal via de repressão da expressão gênica mediada por miRNAs (BARTEL, 2004; CARBONELL et al., 2012)). Em geral, miRNAs apresentam extensa complementaridade com os seus alvos, de modo que a ocorrência de miRNAs com mais de 5 mismatches em relação à região de hibridização é rara (SCHWAB et al., 2005). A clivagem, ou dicing, é realizada pelo domínio PIWI das proteínas AGO, resultando em um fragmento 5' contendo um grupo hidroxila na extremidade 3' e um fragmento 3' contendo um grupo monofosfato na extremidade 5' (MI et

al., 2008). Os fragmentos de RNA gerados são, posteriormente, degradados através da ação das proteínas XRN4, uma exorribonuclease 5'-3' citoplasmática, HESO1, responsável pela oligouridilação da extremidade 3' de fragmentos 5', RICE1, exorribonuclease responsável pela degradação de fragmentos 5' oligouridilados, e do exossomo citoplasmático (SOURET; KASTENMAYER; GREEN, 2004; ZHANG et al., 2017).

A inibição da tradução é outro mecanismo de regulação pós-transcricional da expressão gênica mediada por miRNAs. Diversos estudos demonstraram este mecanismo através da comparação entre os níveis de transcritos e proteínas de genes alvo (ALONSO-PERAL et al., 2010; CHEN, 2004; GANDIKOTA et al., 2007; LI; ZACHGO, 2013), o qual parece estar relacionado com a inibição das etapas de início e/ou alongação da tradução (IWAKAWA; TOMARI, 2013). Dentre as proteínas relacionadas com o processo de inibição da tradução, encontram-se as proteínas KATANIN1 (KTN1), VARICOSE (VCS), SUO e ALTERED MERISTEM PROTEIN 1 (AMP1) (BRODERSEN et al., 2008; LI; ZACHGO, 2013; YANG; WU; POETHIG, 2012). O fato de que a mutação destes genes interfere seletivamente com a expressão de genes alvo ao nível de tradução, juntamente com a observação de clivagem em sítios de ligação de miRNA de transcritos associados a ribossomos (YU et al., 2016a), sugere tanto a independência entre os 2 mecanismos como a ocorrência de clivagem cotranscricionalmente.

O mecanismo de formação de phasiRNAs (do inglês *phased small-interfering RNAs*) é um fenômeno conservado em organismos vegetais, no qual o(s) fragmento(s) de RNA derivado(s) da clivagem mediada por miRNAs dão origem a pequenos RNAs interferentes secundários em fase, a partir do *dicing* realizado por diferentes membros da família DCL. De modo geral, após a clivagem de transcritos pela proteína AGO, guiada pela hibridização do miRNA associado ao alvo, um dos fragmentos resultantes (5' ou 3') é estabilizado pela proteína SUPRESSOR OF GENE SILENCING 3 (SGS3), a qual se associa ao complexo RISC através do reconhecimento de características específicas da associação entre o miRNA de 22nt e o alvo. O fragmento de fita simples é convertido em molécula de fita dupla através da ação da RNA polimerase RDR6 e é, subsequentemente, clivado por proteínas da família DCL em intervalos de 21 ou 24 nucleotídeos, o que gera diversas espécies de siRNA em fase (CHEN et al., 2010a; YOSHIKAWA et al., 2005,

2013).

A classe dos phasiRNAs, em geral, atuam em cis e são derivados de genes capazes de formar proteínas em dicotiledôneas (como, por exemplo, genes pertencentes às famílias NUCLEOTIDE-BINDING LEUCINE-RICH REPEAT – NB-LRR – e PENTATRICOPEPTIDE REPEAT – PRR) e loci PHAS em monocotiledôneas (os quais são responsáveis pela formação de longos RNAs não codificantes). Também existe uma subclasse de phasiRNAs capaz de regular alvos em trans, derivada de loci TAS, cujos membros são denominados tasiRNAs (do inglês trans-acting small interfering RNAs) (YOSHIKAWA et al., 2005; YU et al., 2018). Dentre os processos biológicos relacionados à atuação de phasiRNAs, encontram-se a resposta a estresses abióticos, estresses bióticos, interação com microrganismos simbiotes e processos relacionados ao desenvolvimento vegetal (ADENOT et al., 2006; FAHLGREN et al., 2006; FEI; XIA; MEYERS, 2013; LI et al., 2014; YOON et al., 2010).

1.6.6 miRNAs e regulação de respostas vegetais a condições de estresse

Sob condições de estresse, recursos metabólicos que, de outro modo, seriam utilizados nos processos de crescimento e desenvolvimento, são direcionados para respostas adaptativas ao estresse, o que envolve a ação conjunta de diversos miRNAs sobre redes regulatórias relacionadas a alterações moleculares, bioquímicas e fisiológicas. De modo geral, tais condições resultam em aumento ou redução da expressão de determinados miRNAs, e, subsequentemente, na depleção de inibidores ou acúmulo de reguladores positivos de respostas adaptativas a condições de estresse (KU et al., 2015; ZHANG; WANG, 2016), respectivamente, embora o impacto sobre a expressão de determinada família de miRNA pode variar de acordo com a espécie, estágio de desenvolvimento, tecido e estresse (tipo, duração e intensidade) considerados, além de variação entre membros da mesma família de miRNA (ZHANG, 2015).

Diversos miRNAs regulados por estresse abiótico foram identificados em espécies de plantas modelo submetidas, dentre outras condições, a temperaturas extremas, elevada salinidade, deficiência nutricional e déficit hídrico. Em plantas de *A. thaliana* submetidas a estresse por baixas temperaturas miR165/166, miR393, miR396, miR408, miR156/157,

miR159/319, miR164, miR394 e miR398 foram induzidos (LIU et al., 2008; SUNKAR; ZHU, 2004). Em *Populus*, miR168a,b e miR477a,b apresentaram expressão induzida, enquanto miR156g-j, miR475a,b e miR476a foram reprimidos sob estresse por baixas temperaturas (LU; SUN; CHIANG, 2008).

Foram identificados diversos miRNAs que são regulados por condições de elevada salinidade. Em plantas de *A. thaliana*, miR156, miR158, miR159, miR165, miR167, miR168, miR169, miR171, miR319, miR393, miR394, miR396 e miR397 foram induzidos em resposta a elevada salinidade, enquanto miR398 apresentou redução da expressão (Liu et al., 2008). A expressão heteróloga de Osa-miR319 em *Agrostis stolonifera* conferiu maior tolerância a condições prolongadas de déficit hídrico e alta salinidade às plantas transgênicas (Zhou et al., 2013), enquanto a expressão heteróloga de Osa-miR393 em *A. thaliana* também aumentou a tolerância das plantas transgênicas a condição de elevada salinidade (Gao et al., 2010).

A ação regulatória de miRNAs também está relacionada a respostas de plantas a estresse por déficit nutricional. A deficiência de enxofre (S) induz a expressão de miR395, o qual reduz a expressão de ATP sulfúrilases, associadas ao processo de assimilação de S, e de proteínas AST68, as quais atuam como transportadores de sulfato de baixa afinidade (Jones-Rhoades et al., 2006; Jones-Rhoades & Bartel, 2004). Sob condições de deficiência de cobre, miR398 é induzido, o que reduz a expressão de proteínas CSDs (Cu/Zn-SODs, classe de superóxido dismutases) e permite o redirecionamento de cobre para outros processos metabólicos (Abdel-Ghany & Pilon, 2008; Yamasaki et al., 2007).

Déficit hídrico resulta na expressão de diversos genes e formação de diferentes proteínas/metabólitos, incluindo Rubisco, principal enzima relacionada com a fase bioquímica de fixação do carbono da fotossíntese; proteínas LEA (do inglês “late embryogenesis abundant”); prolina, aminoácido relacionado à osmoproteção de componentes celulares que também atua como soluto compatível; desidrinas; glutatona S-transferase (GST), enzima relacionada à manutenção da homeostase redox intracelular; carboidratos, dentre outros, o que envolve a atuação regulatória de miRNAs (Nezhadahmadi et al., 2013).

Em *A. thaliana*, sob condições de déficit hídrico, miR156, miR159, miR167, miR168, miR171, miR172, miR319, miR393, miR394a, miR395, miR396 e miR397 foram induzidos,

enquanto miR161, miR168, miR169, miR171a e miR319c foram reprimidos (Liu et al., 2008; Sunkar & Zhu, 2004). miR169 atua na regulação de fatores de transcrição da família NF-Y e a sua repressão ou a expressão constitutiva de NFYA5, subunidade deste fator de transcrição, conferem tolerância à seca (Li et al., 2008). miR159 está relacionado à dormência de sementes sob condições de estresse e a sua indução resulta na clivagem de transcritos dos fatores de transcrição MYB101 e MYB33, reguladores positivos de respostas relacionadas ao ABA (Reyes & Chua, 2007). miR164 é um regulador negativo da senescência foliar, o qual é induzido pela proteína EIN2 (componente da via de transdução de sinal do fitormônio etileno) e tem o fator de transcrição NAC1 como um de seus alvos (Jin et al., 2009). A expressão de miR166 é reprimida por déficit hídrico, enquanto sua expressão é induzida pelos fatores de transcrição SHR (do inglês “SHORT-ROOT”) e SCR (do inglês “SCARECROW”) e apresenta como alvos fatores de transcrição da família HD-Zip (Carlsbecker et al., 2010; Cui et al., 2012; Kantar et al., 2010). miR393 atua na regulação de proteínas F-box, como, por exemplo, a proteína TIR1 (do inglês “transport inhibitor response 1”), a qual atua como receptor de auxina e é um regulador positivo da sinalização realizada por este fitormônio, através da degradação de proteínas Aux/IAA, inibidoras de fatores de transcrição responsivos a auxinas (ARFs, do inglês “Auxin Response Factors”) (Chen et al., 2012).

No que diz respeito a respostas de plantas a condições de estresse biótico, a atuação de miRNAs foi identificada em diversos patossistemas, como, por exemplo, na infecção de tomate por *Phytophthora infestans* (LUAN et al., 2015), na infecção de *Camellia sinensis* por *Colletotrichum gloeosporioides* (JEYARAJ et al., 2019) e na interação entre plantas de arroz e o patógeno *Erysiphe graminis f.sp. tritici* (XIN et al., 2010).

A ação regulatória de miRNAs sobre vias metabólicas relacionadas a processos de crescimento/desenvolvimento e defesa contra patógenos é fundamental em plantas sob condições de estresse biótico e diversas famílias de miRNAs estão relacionadas a respostas a infecções por diferentes tipos de patógenos. A via de sinalização de auxinas é um regulador positivo de processos celulares vinculados ao crescimento e desenvolvimento e representa um nó de interação entre diferentes vias hormonais, atuando, por exemplo, na repressão de vias metabólicas relacionadas ao ácido salicílico (DHARMASIRI et al., 2005; NASEEM et al., 2015). Os

componentes da via de sinalização auxínica, como receptores, co-receptores e fatores de transcrição, são alvos comuns de famílias de miRNAs conservados responsivos tanto a estresse biótico como abiótico, dentre os quais destacam-se miR393, miR160, miR167 e miR164. MiR393 foi o primeiro miRNA com demonstração de responsividade a estresse biótico, cuja expressão é induzida pelo PAMP bacteriano flg22 (flagellin 22) , e está relacionado tanto à regulação da via auxínica, por meio da clivagem de transcritos das proteínas receptoras TIR1 (do inglês “Transport Inhibitor Response1”), AFB1 e AFB2 (do inglês “Auxin-signalling F-Box”) (LI et al., 2010; NAVARRO et al., 2006), como à biossíntese de metabólitos secundários relacionados à defesa contra patógenos, atuando, como regulador positivo da biossíntese de isoflavonoides (WONG et al., 2014). Assim como miR393, a expressão de miR160 e miR167 é induzida por PAMP bacteriano, o que indica a atuação destes miRNAs no processo de PTI (LI et al., 2010). No entanto, enquanto miR393 regula a expressão de proteínas receptoras e co-receptoras, miR160 e miR167 regulam a expressão de proteínas ARF (do inglês “Auxin Response Factors”), fatores de transcrição responsáveis pela indução ou inibição de genes responsivos a auxina. Mais especificamente, foi demonstrado que miR160 atua na regulação das proteínas ARF10, ARF16 e ARF17 (RHOADES et al., 2002), enquanto miR167 regula as proteínas ARF6 e ARF8 (JONES-RHOADES; BARTEL; BARTEL, 2006). Membros da família miR164 regulam a expressão de fatores de transcrição da família NAC e estão relacionados tanto ao controle da homeostase auxínica como ao desenvolvimento de respostas de hipersensibilidade sob condições de infecção por patógenos (GUO et al., 2005; LEE et al., 2017).

A atuação de miRNAs em respostas celulares vegetais a condições de estresse biótico também inclui a regulação da expressão de AGO1 e proteínas NLR, da homeostase de fitormônios de defesa e da formação de EROs. A homeostase e disponibilidade de proteínas AGO1 estão relacionadas à atividade regulatória de miR168, o qual tem como alvo moléculas de mRNA que codificam AGO1 (VAUCHERET; MALLORY; BARTEL, 2006). A expressão de proteínas NLR, envolvidas no reconhecimento de efetores e no estabelecimento do processo de ETI, é regulada por siRNAs secundários, produzidos a partir da ação de diferentes miRNAs, dentre os quais podem ser citados miRNAs pertencentes às famílias miR482, miR2109 e miR1507 (CHEN et al., 2010b; LI et al., 2012, 2010; SHIVAPRASAD et al., 2012). EROs são formadas sob condições de

estresse biótico e abiótico, nas quais tanto a redução como o incremento de sua concentração intracelular podem exercer importantes funções para o estabelecimento de respostas adequadas às condições de desequilíbrio (HÜCKELHOVEN; KOGEL, 2003). Dentre as proteínas relacionadas ao controle da concentração de EROs, alguns membros das famílias SOD (do inglês “Superoxide Dismutase”) e Citocromo C oxidase são controlados por miR398, cuja expressão é alterada tanto por estresse abiótico como por exposição a PAMPs, o que indica a sua atuação no processo de PTI (JAGADEESWARAN; SAINI; SUNKAR, 2009).

2 Objetivos

2.1 Geral

Identificar e analisar a expressão diferencial dos microRNAs de *A. duranensis*, uma espécie de amendoim, associados à regulação de respostas de defesa contra infecção por nematoide das galhas (*M. arenaria*) e em resposta ao déficit hídrico (seca).

2.2 Específicos

- Processar bibliotecas de pequenos RNAs obtidas por meio de metodologia de sRNA-Seq, provenientes de tecidos de raízes de *A. duranensis* controles ou submetidas a (i) infecção por nematóide das galhas e (ii) déficit hídrico;

- Identificar e analisar as estruturas secundárias dos miRNAs conservados, não-conservados e novos presentes nas bibliotecas de pequenos RNAs obtidas;

- Identificar miRNAs diferencialmente responsivos a (i) infecção por nematoide das galhas e (ii) déficit hídrico, em comparação às amostras controle;

- Identificar os potenciais genes-alvo dos miRNAs identificados.

3 Material e Métodos

3.1 Bioensaios e extração do RNA

Os bioensaios de seca e infecção por nematóides foram realizados pela equipe do Laboratório Planta-Praga sob a supervisão das pesquisadoras Patrícia Messenberg Guimarães e Ana Cristina Brasileiro Miranda e foram publicadas previamente (MOTA et al., 2021). De forma resumida, plantas de *A. duranensis* foram cultivadas com 70% da capacidade de campo em casa de vegetação durante seis semanas. Para os bioensaios de infecção (INOC), as plantas foram inoculadas com 10.000 juvenis (J2) de *M. arenaria* (raça 1) e mantidas por sete dias com condições normais de hidratação. Para os bioensaios de seca (DRY), as plantas foram submetidas a um decréscimo gradual de hidratação do solo, até atingir 25% da capacidade de campo, através da técnica de retenção da irrigação por sete dias. As amostras controles (CTRL) foram mantidas sob 70% da capacidade de campo pelo mesmo período e foram usadas como referência nas comparações com as amostras inoculadas e as amostras submetidas ao estresse hídrico. O RNA foi extraído de raízes de três réplicas biológicas de cada tratamento e controle usando mirVana™ miRNA Isolation Kit (ThermoFischer Scientific), totalizando nove amostras.

3.2 Sequenciamento de sRNAs via Illumina (sRNA-seq)

As nove amostras de pequenas frações de RNA de raízes de *A. duranensis* foram enviadas para a University of Illinois, EUA, para serem sequenciadas. As bibliotecas foram preparadas usando o kit NEBNext Small RNA Sample Prep. As bibliotecas foram quantificadas por qPCR e sequenciadas em uma única *lane* por 51 ciclos, single-end, em um equipamento HiSeq4000 usando a versão 1 do kit de sequenciamento desta máquina. Os arquivos fastq foram gerados e demultiplexados com o software de conversão bcl2fastq v2.20 da Illumina. Os adaptadores foram trimados na região 3' das leituras.

3.3 Pipeline de análise das bibliotecas obtidas com o sequenciamento

Os dados brutos do sequenciamento de pequenos RNAs (sRNA-Seq) foram submetidos a um pipeline de análise bioinformática desenvolvido pela Laboratório de Bioinformática (LBI) da

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN). Este pipeline consiste em uma sequência de etapas de processamento, as quais se utilizam de ferramentas de software desenvolvidas por terceiros ou ferramentas de software desenvolvidas pelo LBI (*in-house*), e são responsáveis pelo pré-processamento dos dados, anotação de loci MIR, quantificação de miRNAs maduros, identificação de miRNAs conservados por homologia, identificação de miRNAs novos por análise multifatorial, identificação de miRNAs diferencialmente expressos e identificação de potenciais alvos e vias metabólicas associadas a estes alvos (Figura 9).

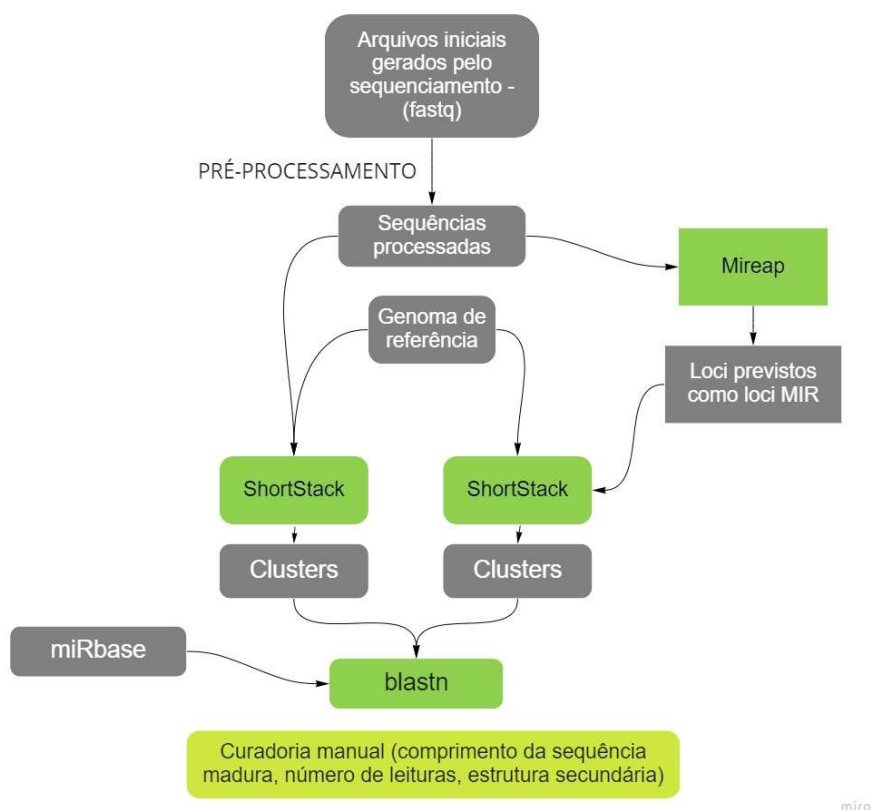


Figura 9: Esquema geral do pipeline de bioinformática desenvolvido pelo LBI para análise de dados provenientes de sRNA-Seq

3.3.1 Pré-processamento

A etapa de pré-processamento é responsável pela remoção de adaptadores das

sequências presentes nas bibliotecas de transcritos, seleção de sequências com tamanho especificado e remoção de contaminantes. O programa cutadapt (MARTIN, 2011) foi usado para remover os adaptadores inseridos no processo de sequenciamento e para selecionar as leituras com tamanho entre 20 e 24 nucleotídeos. Em seguida foi realizada a remoção de contaminantes, isto é, sequências pertencentes a classes de RNAs não-codificantes estruturais (rRNAs, tRNAs, snRNAs e snoRNAs) por meio do mapeamento das leituras trimadas e filtradas com a base de dados Rfam V12 através do bowtie, programa de alinhamento ultra-rápido e com eficiente uso de memória, desenvolvido para o alinhamento de leituras de tamanhos pequenos. Para o presente trabalho foi utilizada a versão 1.2.1 do bowtie (LANGMEAD et al., 2009).

3.3.2 Identificação de loci MIR e quantificação de transcritos

Os dados resultantes das etapas anteriores foram submetidos a dois programas preditores de loci MIR: ShortStack (JOHNSON et al., 2016) e mireap (<https://github.com/liqb/mireap>). Ambos os programas foram desenvolvidos para a predição de miRNAs em plantas. O mireap é mais eficiente na identificação dos loci MIR. Já o ShortStack é excelente em classificar os loci MIR de acordo com os critérios de anotação e produz uma tabela de contagem de leituras por loci MIR, que foram usadas para as análises de expressão diferencial. Assim, neste trabalho, os miRNAs foram preditos pelo Shortstack e pelo mireap+Shortstack. Para fins de entendimento neste trabalho, toda menção ao mireap implica que os dados se referem os resultados obtidos por este programa com a classificação e contagem das reads por locus MIR pelo Shortstack.

3.3.2.1 Shortstack

Os arquivos fastq sem adaptadores e sem contaminantes (outras classes de RNA) foram mapeados com o bowtie (-S -a -v 0 -p 10) no genoma de referência de *A. duranensis*, acesso V14167, disponível na base de dados PeanutBase (<https://peanutbase.org/data/v2/Arachis/duranensis/genomes/>). O output, no formato sam foi convertido para formato bam pelo programa SortSam do pacote picard (<https://github.com/broadinstitute/picard>). Os arquivos de cada amostra em formato bam

receberam identificadores que especificassem a sua origem com o programa AddOrReplaceReadGroups.jar do pacote picard (<https://github.com/broadinstitute/picard>) e foram concatenados em um único arquivo com o programa MergeSamFiles.jar, também do pacote picard. O arquivo com os dados concatenados foi então carregado no Shortstack, que também precisa, como input, do genoma em formato fasta.

3.3.2.2 Mireap

Os arquivos fastq sem adaptadores e sem contaminantes (outras classes de RNA) foram transformados para o formato fasta com comandos executados em shell. O programa fastx_collapser foi usado para colapsar as sequências, de forma que após o uso de outros comandos em shell tivéssemos um arquivo com o seguinte formato: “t0000035 3234”. Neste exemplo, o “t0000035” é um identificador para a sequência colapsada e 3.234 corresponde ao número de reads idênticas na amostra. Este arquivo foi mapeado no genoma de referência de *A. duranensis* com o programa bowtie (-a -v 0). O arquivo de saída foi no formato aln. O arquivo .aln contém informações sobre o alinhamento, tais como identificador da sequência, cromossomo e coordenadas. O resultado gerado pelo mireap foi usado como entrada para o Shortstack, que seguiu o protocolo descrito acima.

3.3.2.3 Classificação dos miRNAs pelo Shortstack

O Shortstack é responsável pela quantificação de leituras relacionadas a cada loci, que servirá de arquivo de entrada para a análise de expressão gênica diferencial. Além disso ele classifica os loci MIR de acordo com a sequência do miRNA maduro (parâmetro “Major RNA”), o comprimento predominante de leituras alinhadas ao locus (parâmetro “DicerCall”) e a classificação de cada loci identificado em diferentes classes (parâmetro “MIRNA”), as quais refletem o cumprimento ou não de requerimentos estabelecidos pela literatura para a classificação de um gene como gene MIR. Estas classes estão organizadas sequencialmente e a classificação de um loci em determinada classe implica o descumprimento de específico requerimento representado pela classe em questão, com exceção da classe “Y”, a qual representa loci que passaram em todos os testes. Dentre as classes definidas pelo ShortStack,

encontram-se:

- N1: locus não apresentou nenhuma leitura alinhada;
- N2: parâmetro DicerCall inválido;
- N3: abundância do Major RNA foi menor que 2 leituras;
- N4: o comprimento do Major RNA está fora dos limites delimitados pelo usuário ou pelo programa (por padrão);
- N5: o comprimento do locus é maior que o máximo permitido (parâmetro definido pelo usuário ou pelo programa, o qual define, por padrão, um comprimento máximo de 300 nt);
- N6: não foram identificadas leituras para ambas as fitas do precursor;
- N7: falha da formação da estrutura de hairpin do precursor;
- N8: a fita do provável miRNA maduro é oposta à fita do locus;
- N9: não foi possível obter a sequência do Major RNA;
- N10: falha na computação da posição do miRNA*;
- N11: provável miRNA maduro apresentou mais de 5 bases sem pareamento na estrutura secundária prevista do precursor;
- N12: provável miRNA não estava contido em uma única estrutura de hairpin prevista;
- N13: provável duplex miRNA maduro/miRNA* apresentou mais de 2 bases não pareadas em posições distintas (“bulges”) ou mais de 3 bases pareadas em sequência;
- N14: processamento impreciso, com base na baixa quantidade (menos de 50% das leituras totais) de leituras relacionadas ao provável miRNA maduro, miRNA* e seus variantes;
- N15: provável miRNA. O locus em questão passou em todos os testes, porém leituras relacionadas ao miRNA* não foram identificadas;
- Y: locus em questão passou em todos os testes, incluindo o sequenciamento do miRNA*.

3.3.3 Seleção dos loci MIR e curadoria

Os loci MIR selecionados para seguirem para a curadoria foram aqueles classificados como Y ou N15 com sequência do miRNA maduro entre 20 e 22nt em pelo menos um dos dois programas. Foram considerados preditos por ambos os programas os loci MIR que apresentaram a mesma coordenada genômica.

A anotação por homologia dos miRNAs preditos foi realizada com o uso do programa blastn, aonde a sequência consultada (query) foi a sequência do miRNA maduro e as sequências alvo (subject) foram as sequências de miRNAs maduros presentes no banco de dados miRbase (Release 22.1) (KOZOMARA; BIRGAOANU; GRIFFITHS-JONES, 2019). O programa blastn foi executado localmente. Alinhamentos com e-value maior que 10-E4 foram anotados. As

sequências não identificadas por homologia foram submetidas a um processo de análise dos seguintes parâmetros: número de leituras (ao menos 100), tamanho da sequência do miRNA maduro previsto (entre 20 e 22 nt) e análise da estrutura secundária do pre-miRNA para serem considerados ou não miRNAs inéditos. A análise da estrutura foi realizada com os programas strucVis (<https://github.com/MikeAxtell/strucVis>) e com a API Forna disponibilizado pelo Vienna RNAfold WebServer (GRUBER; BERNHART; LORENZ, 2015) inserida em uma aplicação in-house, com o objetivo de auxiliar na organização de informações e proporcionar a visualização da estrutura secundária da molécula precursora e das leituras alinhadas, o que, como já foi relatado, é essencial para a anotação de novos loci MIR.

A ferramenta foi implementada inteiramente na linguagem de programação interpretada Javascript e utilizou o framework Electron (<https://www.electronjs.org>), o qual permite o desenvolvimento de aplicações desktop multi-plataforma. A visualização da estrutura secundária da molécula precursora e das leituras alinhadas foi possibilitada pela utilização do webservice Forna server, componente do pacote de web services denominado ViennaRNA Web Services, disponibilizado pelo Instituto de Química Teórica da Universidade de Viena (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>). A análise foi realizada seguindo todos os parâmetros definidos por Axtell & Mitchel (2018).

Posteriormente à identificação de miRNAs por homologia com sequências presentes no miRbase e identificação de miRNAs inéditos, foi realizada uma revisão dos resultados obtidos, na qual cada miRNA identificado pelo blastn foi avaliado quanto à conformidade da estrutura secundária do precursor em relação aos padrões estabelecidos por Axtell & Mitchel (2018).

3.4 Predição de alvos

A predição de genes alvo dos miRNAs identificados pelas etapas anteriores foi realizada através da utilização do psRNATarget (DAI; ZHUANG; ZHAO, 2018), servidor web para análise e predição de genes alvo de sRNAs. Dentre os parâmetros escolhidos para a análise, foi utilizada a biblioteca de transcritos referente à espécie *A. duranensis* (Aradu1.1, v1.1), disponível na interface web do psRNATarget, e os resultados foram limitados aos 10 principais alvos encontrados, sendo que os demais parâmetros foram mantidos com o valor padrão pré-definido.

3.5 Análise da expressão diferencial

A análise da expressão diferencial dos loci MIR identificados foi realizada por meio de script escrito na linguagem de programação R, o qual utilizou funções, objetos e métodos nativos da linguagem, além de utilizar os pacotes DESeq2 (LOVE; ANDERS; HUBER, 2014) e edgeR (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010) . O pacote DESeq2 foi utilizado para avaliar a reprodutibilidade dos dados obtidos à análise em questão, através da visualização em gráficos do tipo Heatmap e PCA da matriz de distâncias euclidianas entre as nove amostras. O pacote edgeR foi utilizado para as etapas de normalização dos dados, estimação da variância e inferência da expressão diferencial. Foram considerados miRNAs diferentemente expressos aqueles que apresentaram \log_2FC maior que 1 (induzido), menor que -1 (reprimido), com $FDR < 0,05$.

4 Resultados

4.1 Sequenciamento e pré-processamento

O número de sequências obtidas com o sequenciamento foi, em média, 43.887.600 por amostra (valores entre 32.5M a 50.3M). As bibliotecas pertencentes aos controles (CTRL) apresentaram média de 47.982.963 sequências, enquanto as bibliotecas pertencentes às amostras inoculadas (INOC) tiveram, em média, 46.094.053 sequências. Já as bibliotecas pertencentes ao tratamento de estresse hídrico (DRY) apresentaram, em média, 37.585.782 sequências, uma quantidade consideravelmente mais baixa que as demais amostras.

Após a retirada dos adaptadores e seleção das sequências com tamanhos entre 20 e 24 nt, foram obtidas, em média, 17.135.863 sequências por amostra. As bibliotecas pertencentes ao tratamento controle (CTRL) permaneceram com média de 20.761.300 (remoção de 27.221.663 sequências), as bibliotecas INOC permaneceram com média de 18.803.134 sequências (remoção média de 27.290.919) e as bibliotecas DRY apresentaram média de 11.843.155 sequências (remoção de 25.742.627 sequências).

A remoção de contaminantes através do mapeamento das sequências de cada amostra com a base de dados Rfam V12 revelou que a média de sequências consideradas contaminantes por biblioteca foi de 2.991.102 sequências. Ao final das etapas de pré-processamento, bibliotecas com média de 14.144.427 sequências foram usadas na predição de miRNAs. Os dados estão compilados na Tabela 1.

Tabela 1: Número de leituras (e suas porcentagens) de cada amostra: arquivo bruto, após o cutadapt, quantidade contaminantes e dados finais após o mapeamento com o bowtie. CTRL = controle, INOC = inoculado com *M. arenaria* e DRY = déficit hídrico

Tratamento	Réplica Biológica	Arquivos brutos	Após o cutadapt	Contaminantes	Dados finais
CTRL	1	48.425.360 (100%)	18.245.766 (37,68%)	2.684.658 (5,54%)	15.561.108 (32,13%)
	2	45.238.841 (100%)	19.589.455 (43,30%)	2.632.972 (5,82%)	16.956.483 (37,48%)
	3	50.284.688 (100%)	24.448.677 (48,62%)	2.378.139 (4,73%)	22.070.538 (43,89%)
	Média	47.982.963 (100%)	20.761.300 (43,26%)	2.565.256 (5,34%)	18.196.043 (37,92%)
INOC	1	44.782.877 (100%)	17.965.430 (40,11%)	3.138.128 (7,00%)	14.827.302 (33,10%)
	2	44.138.571 (100%)	18.954.297 (42,94%)	2.612.915 (5,91%)	16.341.382 (37,02%)
	3	49.360.711 (100%)	19.486.673 (39,47%)	3.341.155 (6,76%)	16.145.518 (32,70%)
	Média	46.094.053 (100%)	18.803.134 (40,79%)	3.031.732 (6,57%)	15.771.400 (34,21%)
DRY	1	32.531.888 (100%)	9.344.051 (28,72%)	2.506.181 (7,70%)	6.837.870 (21,01%)
	2	35.127.795 (100%)	11.868.645 (33,78%)	3.177.767 (9,04%)	8.690.878 (24,74%)
	3	45.097.663 (100%)	14.316.769 (31,74%)	4.447.997 (9,86%)	9.868.772 (21,88%)
	Média	37.585.782 (100%)	11.843.155 (31,50%)	3.377.315 (8,98%)	8.465.840 (22,52%)

4.2 Predição dos precursores e dos mRNAs maduro e *star*

Após a etapa de pré-processamento, as sequências livres de adaptadores, com tamanho entre 20 e 24 nt e sem outras classes de moléculas de RNA senão os pequenos RNAs, de cada biblioteca foram utilizadas para a predição dos precursores e anotação de loci MIR por meio dos programas mireap e ShortStack. O programa Shortstack classifica os precursores candidatos de acordo com a tabela de códigos descrita na seção Material e Métodos. Neste trabalho, os precursores e miRNAs candidatos foram aqueles classificados como “N15” ou “Y” com tamanhos do miRNA maduro entre 20 e 22 nt. É importante frisar que, nesta parte do trabalho, todas as sequências obtidas foram analisadas em conjunto, uma vez que o objetivo foi descrever os miRNAs presentes na espécie *A. duranensis*.

O Shortstack identificou um total de 420.149 possíveis precursores de miRNAs. Destes, 418.585 candidatos (99,62%) apresentaram características indesejáveis e foram descartados nas análises subsequentes. Um total de 1.502 candidatos (0,35%) foram considerados possíveis precursores, uma vez que passaram em todos os critérios estabelecidos, exceto a identificação de sequências do miRNA* (código N15). 62 precursores (0,014%) passaram por todos os critérios de classificação, incluindo a presença do miRNA* exato sequenciado (código Y), e foram, deste modo, considerados precursores de miRNAs. As informações sobre tamanho médio do precursor, número médio de leituras por candidato e tamanho médio do miRNA estão compiladas na Tabela 2. É importante notar que o tamanho médio das sequências de miRNAs dos candidatos classificados como “Y” foi de 21,12 nt, o tamanho esperado e mais comum de miRNAs de plantas.

O programa mireap gerou uma quantidade muito menor de precursores candidatos a loci MIR: um total de 11.888. A validação desses candidatos por esta ferramenta precisa ser feita de forma manual, o que demanda tempo e é passível de muitos erros de julgamento. Por isso, os resultados obtidos pelo mireap foram formatados por scripts in-house e foram usados no programa Shortstack para posterior classificação pelo esquema de códigos N1-N15/Y do ShortStack (Tabela 2).

De forma similar aos resultados do Shortstack, a maioria dos candidatos (11.069, ou 93,11%) foram classificados com os códigos N1-N14 e foram, por tanto, desconsiderados neste

trabalho. Um total de 763 clusters (6,42%) foram classificados como N15 e 56 clusters (0,47%) foram classificados como Y. As informações sobre tamanho médio do precursor, número médio de leituras por candidato e tamanho médio do miRNA estão compiladas da Tabela 2. Similarmente ao que foi observado nos resultados do Shortstack, o tamanho médio das sequências de miRNAs dos candidatos classificados como “Y” foi de 20,91 nt.

Tabela 2: Resultados obtidos com os programas Shortstack e mireap/Shortstack. Número de candidatos a genes MIR identificados por código de classificação, comprimento médio do precursor, número médio de leituras por cluster e tamanho médio da sequência do miRNA maduro prevista para diferentes classes definidas pelo ShortStack.

Code	Total de candidatos		Comprimento Médio do Precursor		Número médio de leitura por clusters		Tamanho médio da sequência prevista	
	ShortStack	mireap	ShortStack	mireap	ShortStack	mireap	ShortStack	mireap
N3	0	22	0	151	0	6	0	21,9
N5	0	2295	0	334	0	1028	0	22,51
N6	270834	5539	160	183	272	73	23,17	22,47
N8	0	9	0	157	0	35	0	22,11
N10	0	14	0	282	0	295	0	23,71
N11	136473	2380	115	170	284	347	23,05	22,25
N12	0	205	0	148	0	128	0	21,75
N13	7623	350	120	169	507	53	22,65	21,84
N14	3655	255	136	179	237	168	22,34	21,91
N15	1502	763	81	153	4070	1789	22,02	21,46
Y	62	56	161	119	28298	43999	21,12	20,91
Total	420.149	11.888						

Os resultados obtidos com os dois preditores passaram a ser tratados como um resultado único a partir deste ponto. Um total de 1446 candidatos, sendo 75 “Y” e 1371 “N15”, que foram preditos por pelo menos um dos programas e apresentaram sequência prevista do miRNA maduro entre 20 e 22 nt, seguiram para as próximas etapas.

4.3 Curadoria e anotação dos miRNAs de *A. duranensis*

As sequências candidatas a miRNAs foram alinhadas, com o blastn, contra os miRNAs depositados na base de dados miRbase. Um total de 97 sequências obtiveram resultados significativos ($e\text{-value} < 10E\text{-}4$) e os respectivos loci foram anotados. Destes, 33 foram preditos apenas pelo Shortstack, 18 foram preditos apenas pelo mireap e 46 foram preditos por ambos os programas. Um total de 32 famílias de miRNAs conservadas entre plantas ou conservadas em leguminosas foram identificadas (Figura 10). As famílias de miRNAs com o maior número de loci foram a miR172 e miR156, com 11 cada.

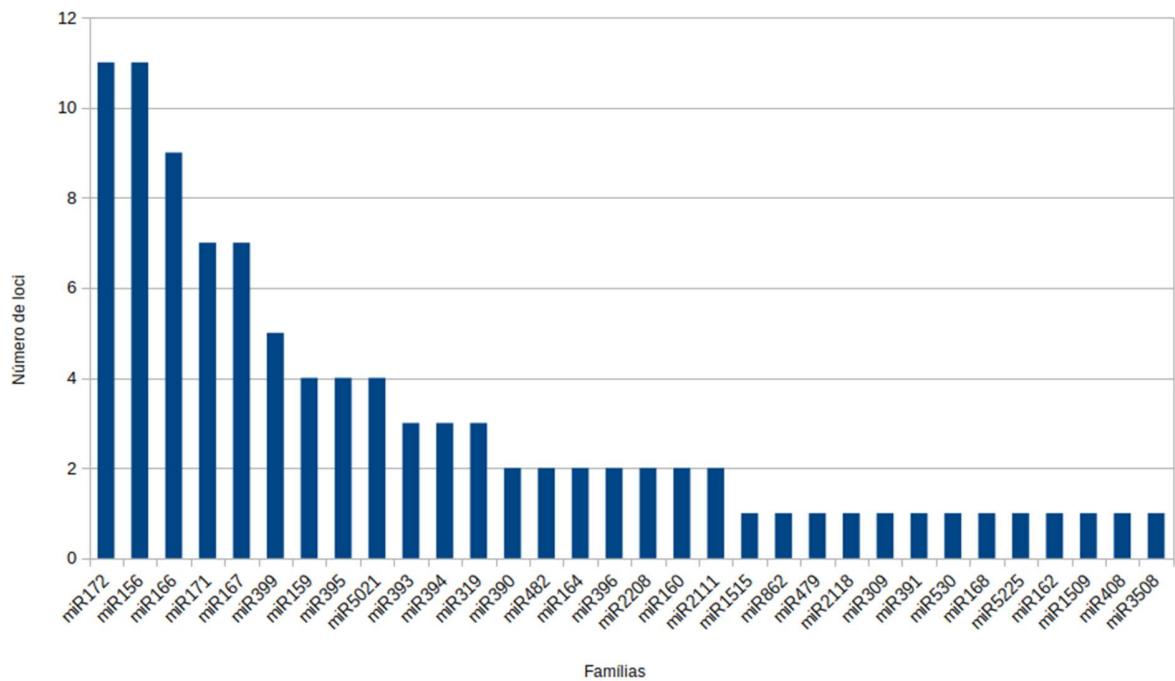


Figura 10: Número de loci identificados em famílias de miRNAs de plantas

Os clusters identificados, filtrados de acordo com parâmetros pré-estabelecidos e que não apresentaram hit significativo em relação a alguma sequência presente no miRbase foram submetidos a processo de curadoria semi-automatizado, o que resultou na identificação de 21 novos loci MIR, dentre os quais, 16 foram preditos apenas pelo ShortStack, três foram preditos apenas pelo mireap e dois novos loci foram preditos por ambos os programas.

As estruturas secundárias dos miRNAs anotados foram analisadas pelo programa desenvolvido miRNAvis. A figura 11 mostra quatro exemplos de estruturas corretas, sendo três de miRNAs conservados e uma de um miRNA inédito encontrado neste trabalho.

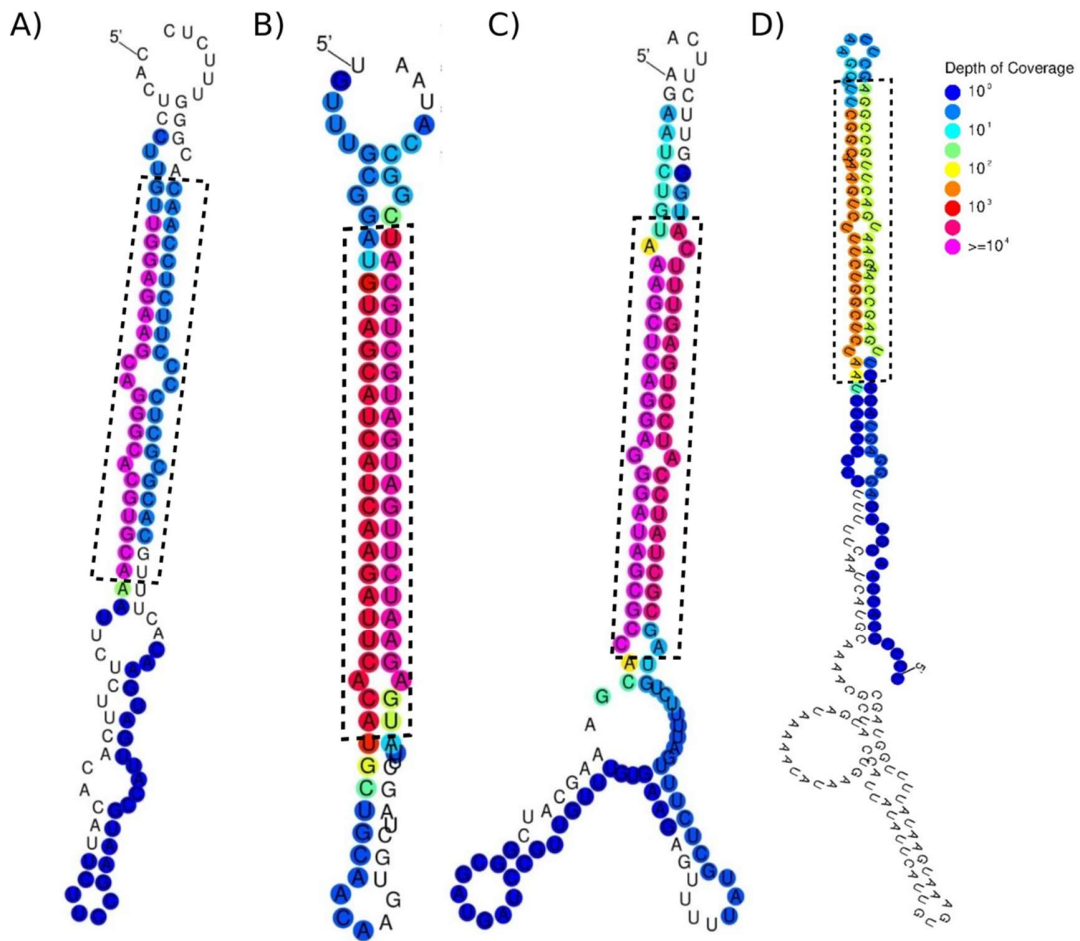


Figura 11: Visualização da estrutura secundária e cobertura de leitura gerada pelo programa strucVis. A, B e C: visualização de três loci MIR conservados (miR164, miR172 e miR390, respectivamente); D: visualização do locus inédito novo20.

4.4 Predição dos genes alvos dos miRNAs identificados

As seqüências dos miRNAs conservados e inéditos foram submetidas ao programa psRNatarget (DAI; ZHUANG; ZHAO, 2018) para a predição dos genes alvos. Para os loci MIR conservados, a maioria dos alvos preditos está de acordo com os alvos descritos pela literatura, embora, em alguns casos, os resultados foram diferentes. Para os miRNAs inéditos, foram preditos alvos para a maioria dos loci, exceto para novo13 e novo16.

Tabela 3: Loci MIR identificados pelo pipeline (conservados e inéditos) e respectivos genes alvo preditos pelo programa psRNATarget.

Família	Alvo(s) predito(s)
miR172	Related to AP2.7 (RAP2.7); APETALA2 (AP2)
miR156	SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE SPL2, SPL6, SPL9, SPL12, SPL13, SPL18
miR166	Homeobox-leucine zipper protein ATHB8, ATHB14, ATHB15, Homeobox-leucine zipper protein REVOLUTA (REVOLUTA)
miR171	SCARECROW 6 (SCR6); SCARECROW 27 (SCR27)
miR167	NAC domain-containing protein 76 (NAC76); Auxin Response Factor 6 (ARF6)
miR399	Probable ubiquitin-conjugating enzyme E2 24 (UBC24)
miR159	MYB domain protein 33 (MYB33)
miR395	SULFATE TRANSPORTER 2.1 (SULTR2.1); ATP sulfurylase 1 (APS1)
miR5021	ALPHA-AMYLASE-LIKE 3 (AMY3); TEOSINTE BRANCHED 1, cycloidea and PCF transcription factor 2 (TCP2); MYB domain protein 34 (MYB34); Basic helix-loop-helix protein 33 (bHLH93)
miR393	Auxin signaling F-box 2 (AFB2); Transport Inhibitor Response 1 (TIR1)
miR394	F-box only protein 6 (FBX6); BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-associated receptor kinase 1 (BAK1)
miR319	MYB domain protein 33 (MYB33); TEOSINTE BRANCHED 1, cycloidea and PCF transcription factor 2 (TCP2); TEOSINTE BRANCHED 1, cycloidea and PCF transcription factor 2 (TCP4)
miR390	ABNORMAL LEAF SHAPE 2 (ALE2)
miR482	E3 ubiquitin-protein ligase SINAT5 (SINAT5)
miR164	NAC domain-containing protein 100 (NAC100), 21/22 (NAC21/22), 98 (NAC98)
miR396	CALMODULIN-BINDING PROTEIN CBP60g (CBP60g)
miR2208	6-Phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH); UDP-sulfoquinovose synthase 1 (SQD1)
miR160	Auxin Response Factor - ARF16, ARF17, ARF18
miR1515	MORC Family CW-Type Zinc Finger 3 (MORC3)
miR862	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 1 (GST1)
miR479	Probable carboxylesterase 18 (CXE18)
miR2118	Putative disease resistance RPP13-like protein 1 (RPPL1)
miR309	-
miR2111	TRANSMEMBRANE KINASE 4 (TMK4)
miR391	Histone Deacetylase 2 (HDAC2)
miR530	WRKY DNA-binding protein 35 (WRKY35)
miR168	Argonaute RISC Component 1 (AGO1)
miR5225	-
miR162	Dicer-like 1 (DCL1)
miR408	Laccase (LAC)
miR3508	Polyphenol oxidase (PPO), Pectin methylesterase 31 (PME31)
miR1509	-
novo1	Protein MAIN-LIKE 1 (MAIL1)
novo2	Beta-glucosidase BoGHB3-like
novo3	E3 ubiquitin-protein ligase MBR2
novo4	Protein ALWAYS EARLY 3-like (ALY3)
novo5	NO POLLEN GERMINATION RELATED 2 (NPGR2)
novo6	GREEN FLUORESCENT SEED 12 (GFS12)
novo7	AGAMOUS-LIKE 62 (AGL62)
novo8	DELLE protein RGA-like 1 (RGL1)
novo9	Cytokinin dehydrogenase 3-like (CKX3)
novo10	Glucose-6-Phosphate 1-dehydrogenase 6 (G6DP6)
novo11	SPATULA (SPT)
novo12	ACT DOMAIN REPEATS 10 (ACR10)
novo13	DEAD/H-Box Helicase 11 (DDX11)
novo14	Abscisic acid 8'-hydroxylase 3 (CYP707A3)
novo15	Flowering time control protein (FPA)

novo16	Não encontrado
novo17	Putative disease resistance RPP13-like protein 1
novo18	Guanylate kinase 2 (GK-2)
novo19	Synaptotagmin 5 (SYT5)
novo20	DDT-RELATED PROTEIN 4 (DDR4)
novo21	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha (PDH-E1 ALPHA)

4.5 Análise da expressão diferencial

As análises de expressão diferencial de miRNAs foram realizadas de forma independente para os dados gerados pelo Shorstack e mireap. É importante lembrar que apenas o Shortstack produz um arquivo de contagem para cada loci MIR predito, independente da sua classificação (N1-N15/Y). O arquivo de entrada para os programas de análise foi completo, e não apenas com o miRNAs selecionados. Isso foi necessário para que a análise estatística fosse executada de forma eficiente, em especial da etapa de normalização das contagens pelo tamanho efetivo das bibliotecas. No entanto os resultados serão apresentados de forma conjunta para facilitar o entendimento.

4.5.1 Reprodutibilidade das réplicas biológicas das amostras CTRL, INOC e DRY

Através da visualização do gráfico da análise de componente principal e heatmap da matriz de distâncias euclidianas entre as nove amostras, antes e após a normalização das contagens pelo edgeR, para os dados resultantes da execução do ShortStack e do mireap, foi possível verificar as amostras de um mesmo tratamento são mais similares entre si do que com amostras de outros tratamentos, indicando que as réplicas biológicas são homogêneas, de acordo com o esperado (Figura 12).

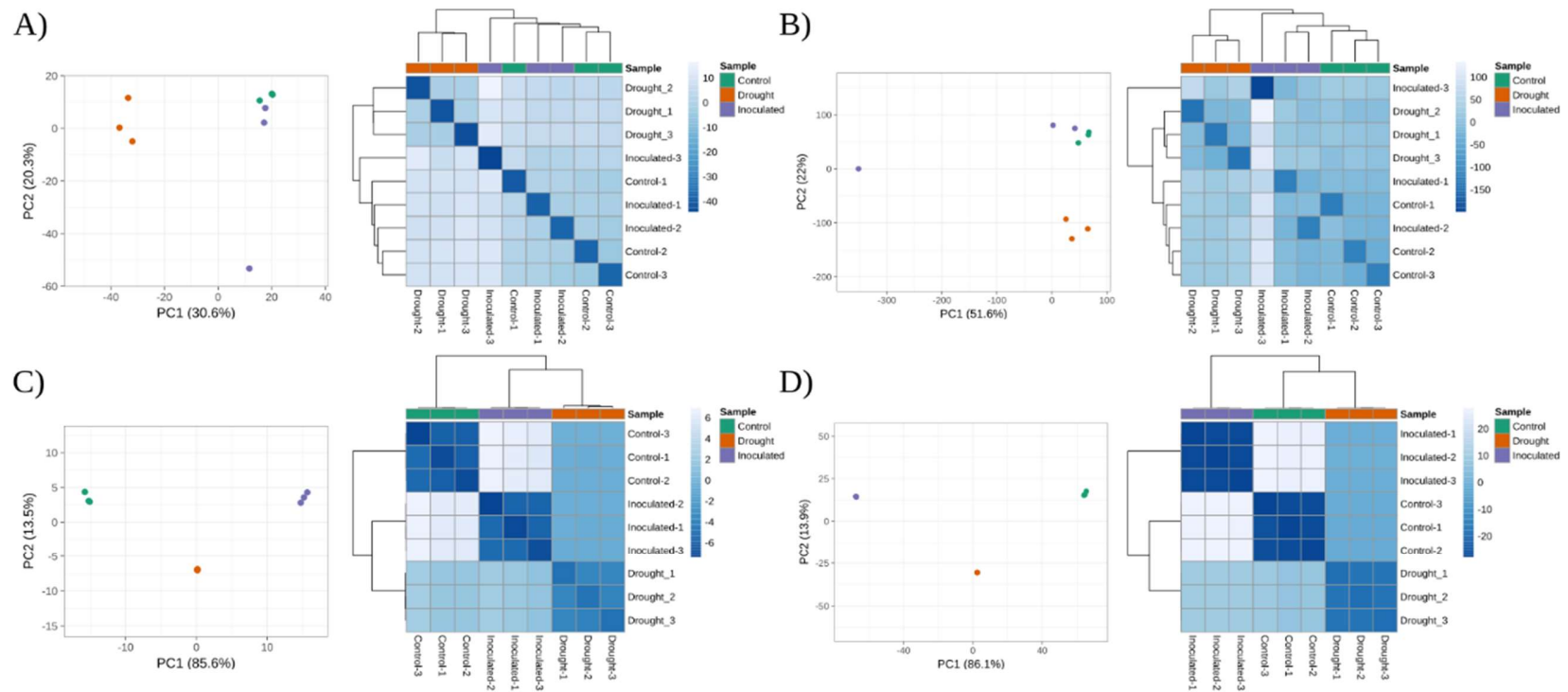


Figura 12: Análise de componente principal de cada amostra (à esquerda de cada figura) e heatmap da matriz de distâncias euclidianas entre amostras (à direita de cada figura). A e B: análises dos dados brutos de cada biblioteca. C e D: análises com os dados normalizados de cada biblioteca. A e C: dados do mireap. B e D: dados do Shortstack. Padrão de cores: verde – controles, vermelho – déficit hídrico e roxo – inoculados.

4.5.2 Inoculação com *M. arenaria*

Um total de cinco famílias de miRNA e um miRNA novo foram diferencialmente expressos em bibliotecas de amostras de tecidos radiculares de plantas de *A. duranensis* inoculadas com juvenis J2 de *M. arenaria*, em relação a bibliotecas provenientes das amostras controle. Algumas famílias apresentaram mais de um loci diferencialmente expresso. A maioria destes miRNAs foram identificados pelo programa mireap (Tabela 4).

Tabela 4: Famílias de miRNA com loci diferencialmente expressos, posição genômica dos loci diferencialmente expressos pertencentes a cada família, valor do log₂FC (log₂ de Fold Change), valor do FDR ('False Discovery Rate'), alteração da expressão e programa preditor responsável pela identificação do locus/loci (INOC x CTRL).

miRNA	Locus	Log ₂ FC	FDR	Expressão	Preditor
miR172	Adur159_1:66386-66652	-1.071	0.047	Reprimido	Mireap
miR399	Adur76:1006055-1006172	-1.379	0.001	Reprimido	Mireap
	Adur140:629158-629253	-2.025	4.71e-08	Reprimido	Mireap
	Adur55:1669372-1669470	-1.527	0.0003	Reprimido	Mireap
miR408	Adur270:250600-250765	-1.477	0.001	Reprimido	ShortStack
miR3508	Adur42:305015-305215	-1.503	0.034	Reprimido	Ambos
miR167	Adur42:111416-111489	2.408	0.006	Induzido	Mireap
Novo2	Adur38_2:354024-54124	-1.817	0.0006	Reprimido	Mireap

4.5.3 Déficit hídrico

Um total de 18 famílias de miRNA apresentaram loci com diferencialmente expressos em bibliotecas de amostras de tecidos radiculares de plantas de *A. duranensis* submetidas a condições de déficit hídrico em relação a bibliotecas provenientes de amostras de tecidos radiculares de plantas do tratamento controle. A maioria destes loci foram identificados pelos dois programas preditores e entre loci pertencentes a uma mesma família, a tendência foi de que todos apresentaram o mesmo tipo de alteração de expressão, embora tenham ocorrido exceções (Tabela 5).

Com relação aos loci anotados como miRNAs pela etapa de curadoria manual, cinco miRNAs inéditos apresentaram alteração de expressão em bibliotecas provenientes de plantas submetidas ao déficit hídrico, sendo que a maioria destes loci apresentou regulação para baixo sob tais condições.

Tabela 5: Famílias de miRNA com loci diferencialmente expressos, posição genômica dos loci diferencialmente expressos pertencentes a cada família, valor do log₂FC (log₂ de Fold Change), valor do FDR ('False Discovery Rate'), alteração da expressão e programa preditor responsável pela identificação do locus/loci (DRY x CTRL).

miRNA	Locus	Log ₂ FC	FDR	Expressão	Preditor
miR166	Adur121:1186234-1186331	-1.438	1.06e-08	Reprimido	ShortStack
	Adur7_2:2705681-2705906	-1.279	7.80e-11	Reprimido	Ambos
	Adur213:1250692-1250842	-1.284	6.65e-11	Reprimido	ShortStack
	Adur20:2884205-2884462	-1.306	4.39e-11	Reprimido	Ambos
	Adur222:585853-586132	-1.388	3.72e-08	Reprimido	Ambos
	Adur237_2:259133-259426	-1.225	1.81e-10	Reprimido	Ambos
	Adur100:1906065-1906202	-1.526	1.54e-05	Reprimido	Mireap
	Adur155:597369-597579	-1.531	1.42e-05	Reprimido	Mireap
miR393	Adur27:1089904-1090021	1.087	0.086	Induzido	Ambos
	Adur1_2:6451445-6451562	1.087	0.086	Induzido	Ambos
miR390	Adur141:1543772-1543841	-1.079	0.0002	Reprimido	Ambos
miR172	Adur11:75054-75199	-1.161	2.64e-06	Reprimido	Ambos
	Adur40_3:1025126-1025344	-4.824	8.70e-20	Reprimido	Ambos
	Adur228:613531-613690	-4.851	1.64e-19	Reprimido	Ambos
	Adur159_1:66618-66686	-2.131	7.32e-09	Reprimido	Ambos
	Adur254:914221-914379	-1.162	2.96e-06	Reprimido	Ambos
	Adur91_3:396995-397123	-1.403	1.92e-08	Reprimido	Ambos
miR159	Adur455:368468-368526	-3.252	0.006	Reprimido	Ambos
	Adur28_2:571718-571739	1.069	0.06	Induzido	ShortStack
	Adur20:1069074-1069290	-1.499	1.88e-14	Reprimido	Ambos
	Adur6_1:1407630-1407809	-3.306	1.21e-11	Reprimido	Ambos
	Adur122:1068692-1068884	1.256	0.004	Induzido	mireap
miR171	Adur102:472029-472213	-1.277	0.001	Reprimido	ShortStack
	Adur824_2:14056-14231	-1.315	0.0002	Reprimido	Ambos
	Adur30_1:799123-799350	-1.425	5.03e-05	Reprimido	ShortStack
	Adur565:248229-248446	-1.898	4.762e-10	Reprimido	Ambos
	Adur110:315837-316012	-1.315	0.0002	Reprimido	Ambos
miR156	Adur43:34273-34402	2.295	2.88e-11	Induzido	Ambos
	Adur28_1:681870-682154	2.199	2.19e-10	Induzido	Ambos
	Adur20:847828-847855	2.418	3.39e-11	Induzido	Ambos
miR2111	Adur974:13061-13226	1.408	0.007	Induzido	Ambos
	Adur366:87065-87230	1.385	0.008	Induzido	Ambos
miR482	Adur169:823032-823294	-1.169	6.74e-07	Reprimido	Ambos
miR862	Adur28_1:1070166-1070257	-1.114	0.024	Reprimido	ShortStack
miR168	Adur63:2611221-2611376	-1.707	8.55e-12	Reprimido	ShortStack
miR399	Adur12_3:36715-36886	-2.503	1.303e-09	Reprimido	ShortStack
	Adur55:1669374-1669461	-1.463	0.002	Reprimido	Ambos

	Adur140:629160-629240	-1.359	0.01	Reprimido	Ambos
	Adur76:982661-982766	-2.469	1.29e-09	Reprimido	Ambos
	Adur76:1006048-1006232	-1.526	0.001	Reprimido	Ambos
	Adur76:1013067-1013184	-1.279	0.0004	Reprimido	ShortStack
miR319	Adur856:211770-212039	1.001	2.44e-06	Induzido	ShortStack
	Adur14_1:730728-730934	-2.614	4.69e-09	Reprimido	ShortStack
miR167	Adur6_1:2426400-2426666	2.973	1.61e-17	Induzido	Ambos
	Adur113:178606-178841	-1.793	5.93e-13	Reprimido	Ambos
	Adur121:339181-339301	-1.831	2.69e-11	Reprimido	Mireap
	Adur76:1500667-1500765	-1.863	3.24e-11	Reprimido	Mireap
	Adur42:111416-111489	5.423	9.44e-49	Induzido	Mireap
miR479	Adur59_2:1487-1773	-2.190	7.53e-10	Reprimido	Ambos
miR398	Adur86_2:734086-734239	-5.388	4.84e-69	Reprimido	Ambos
miR391	Adur138:1102610-1102784	-3.456	7.57e-11	Reprimido	Ambos
miR162	Adur5:3170946-3171035	-1.263	1.47e-08	Reprimido	ShortStack
Novo2	Adur38_2:354024-354124	1.773	9.65e-09	Induzido	Ambos
Novo19	Adur138:610401-610675	-1.163	6.14e-07	Reprimido	Mireap
Novo14	Adur3:5589517-5589676	-1.397	4.63e-10	Reprimido	ShortStack
Novo15	Adur140:1420966-1421085	-1.848	0.02	Reprimido	ShortStack
Novo18	Adur38_2:364860-365047	-1.706	7.27e-05	Reprimido	ShortStack

5 Discussão

As etapas iniciais de tratamento das sequências brutas originadas dos sequenciamentos em larga escala (etapas de pré-processamento) são de grande importância para que o resultado final seja robusto, reproduzível e analisável. As bibliotecas com as sequências brutas provenientes do sequenciamento foram submetidas ao processo de trimagem de adaptadores e filtragem por comprimento da sequência. As bibliotecas resultantes apresentaram, em média, 31,5% do número de sequências presentes nos arquivos brutos, o que demonstra a presença de grande quantidade de sequências com tamanhos não-compatíveis com miRNAs. Subsequentemente, as leituras foram mapeadas contra a base de dados Rfam para a remoção de contaminantes. A média de contaminantes por biblioteca foi de 8,98% do número de sequências dos arquivos brutos, o que representa, aproximadamente, um terço das sequências resultantes do processo de trimagem e filtragem, indicando a elevada quantidade de sequências pertencentes a outras espécies de RNA (estruturais e regulatórios) e outros tipos de contaminantes (como fragmentos resultantes do procedimento de extração) dentre as sequências com comprimento entre 20 e 24 nucleotídeos resultantes da etapa anterior.

As amostras submetidas a condições de déficit hídrico apresentaram, de modo geral, menor número de sequências que as demais bibliotecas, com exceção do número de contaminantes, o qual foi maior (proporcionalmente em relação ao número de sequências presentes nos arquivos brutos) em tais bibliotecas. Isto pode ser explicado pela maior dificuldade e menor qualidade do processo de extração de RNAs de tecidos radiculares submetidos a tal situação.

Os loci MIR preditos pelos programas ShortStack e mireap apresentaram diferenças significativas, em especial com relação ao número total de candidatos identificados, à distribuição dos candidatos identificados entre as diferentes classes definidas pelo ShortStack, ao máximo comprimento do precursor encontrado e ao tamanho médio da sequência de miRNA maduro prevista. A execução do ShortStack resultou na identificação de 420.149 potenciais loci MIR, enquanto o programa mireap identificou 11.888 potenciais loci MIR, os quais foram posteriormente analisados com o Shortstack para análise quanto à conformidade com padrões estabelecidos pela literatura para anotação como miRNAs. Estes resultados revelam a maior

precisão do programa mireap na identificação de loci MIR, quando comparado ao programa ShortStack.

Com relação à distribuição de potenciais loci MIR entre classes definidas pelo ShortStack, os clusters identificados pelo ShortStack foram classificados em seis diferentes classes (N6, N11, N13, N14, N15 e Y), enquanto os clusters identificados pelo ShortStack com agrupamento do mireap foram classificados em 11 diferentes classes (N3, N5, N6, N8, N10, N11, N12, N13, N14, N15 e Y), o que revela maior restringência do algoritmo de identificação de loci MIR do ShortStack quanto a determinadas características do cluster, quando comparado com o mireap. No entanto, a maioria dos potenciais candidatos identificados pelo ShortStack pertenciam às classes N6 e N11 (96,94% do total), enquanto os loci identificados pelo mireap apresentaram distribuição mais uniforme entre as diferentes classes encontradas. De modo geral, foi observada predominância de loci identificados entre as classes N5 (precursor identificado com comprimento maior que 300 nt), N6 (maioria das leituras alinhadas a uma única fita) e N11 (mais de cinco pares de bases nitrogenadas não pareadas na estrutura secundária do precursor), o que indica que a maioria das leituras analisadas não podem ser classificadas como miRNAs, podendo pertencer a outras classes de pequenos RNAs com ação regulatória, como phasiRNA, hc-siRNA, dentre outros .

O valor máximo de comprimento do precursor encontrado entre os potenciais candidatos previstos pelo mireap foi de 334 nt, o que é esperado, uma vez que o programa não aceita nenhum parâmetro de execução que delimite um comprimento máximo de precursor a ser aceito. O programa ShortStack, pelo contrário, permite ao usuário definir um comprimento máximo de precursor a ser aceito, utilizando como valor padrão (caso nenhum valor seja definido no momento da execução) 300 nt de comprimento máximo, valor amplamente aceito pela literatura (AXTELL; MEYERS, 2018).

O número médio de leituras por cluster apresentou comportamento similar entre os potenciais candidatos identificados pelo ShortStack e pelo mireap, no qual clusters com baixa classificação (menor que N15) apresentaram baixo número médio de leituras, raramente ultrapassando 1000 leituras por cluster, enquanto loci classificados como N15 e, principalmente, loci classificados como Y apresentaram elevado número médio de leituras por cluster. Clusters classificados como N15 cumpriram todos os requerimentos para anotação como loci MIR, exceto

a presença de leituras correspondentes ao miRNA*, enquanto clusters classificados como Y cumpriram todos os requerimentos, incluindo a presença de leituras representantes do miRNA* e podem ser anotados como loci MIR, sendo que a presença de elevado número de leituras por cluster corrobora tal classificação.

Neste trabalho, 30 famílias de miRNAs foram identificadas por homologia com sequências presentes no miRbase e verificação manual de parâmetros relacionados à anotação (principalmente a conformidade da estrutura secundária a padrões estabelecidos pela literatura) e 21 loci MIR inéditos foram identificados e anotados pelo processo de curadoria manual. Dentre os miRNAs identificados por homologia, podem ser distinguidos dois grupos: (i) famílias de miRNAs conservadas, encontradas em diferentes espécies vegetais, e (ii) famílias de miRNAs específicas de leguminosas. De modo geral, os miRNAs conservados podem apresentar número variado de loci em genomas de plantas, desde um único locus até vários loci, enquanto miRNAs específicos de leguminosas apresentam, geralmente, de um a dois loci nos genomas destas espécies (ARENAS-HUERTERO et al., 2009; AXTELL, 2013).

Por outro lado, miRNAs específicos de *A. duranensis* apresentam apenas um locus no genoma, como ocorre com os loci MIR identificados por curadoria manual e considerados como miRNAs inéditos. Esta distribuição de número de loci entre diferentes grupos de miRNAs se adequa aos principais modelos que descrevem a origem e evolução de miRNAs em plantas, aonde a duplicação invertida de genes codificantes de proteínas ou repetições invertidas aleatórias dão origem a genes MIR e a forte seleção exercida sobre tais genes determina a existência de miRNAs conservados (regulação de importantes processos relacionados ao crescimento, desenvolvimento e adaptação ao ambiente), de miRNAs específicos de determinadas famílias botânicas (relacionados a processos específicos da família em questão ou relacionados à regulação da expressão de genes R por meio da formação de tasiRNAs) e de miRNAs espécie-específicos, caracterizados por baixa expressão e, algumas vezes, ausência de alvos preditos, o que pode indicar surgimento recente (MORAN et al., 2017; NOZAWA; MIURA; NEI, 2012; TAYLOR et al., 2014).

Os alvos preditos para a maioria dos miRNAs identificados estão de acordo com os alvos comumente preditos pela literatura: para as famílias miR160, miR167 e miR393 os alvos preditos

foram componentes da via de sinalização de auxinas (DING et al., 2017); as famílias miR156, miR166, miR171, miR159, miR319, miR530 e miR5021 possuem como alvos genes que codificam fatores de transcrição (IWAMOTO; TAGIRI, 2016; KIM et al., 2018; KOYAMA; SATO; OHMETAKAGI, 2017; PANI; MAHAPATRA, 2013; SUN et al., 2016; WANG; CZECH; WEIGEL, 2009; YU et al., 2016b), embora este último também tenha apresentado como alvo predito um gene que codifica para alfa-amilase; a família miR395 atua na regulação de genes relacionados ao metabolismo do enxofre (LIANG; YU, 2010); a família miR399 atua na regulação de gene relacionado ao metabolismo de fósforo (HACKENBERG et al., 2013), a família miR394 atua na regulação de uma proteína F-box (GENG et al., 2021), a família miR162 regula a expressão da proteína DICER-LIKE 1 (DCL1) (XIE; KASSCHAU; CARRINGTON, 2003); a família miR168 regula a expressão do gene AGO1 (VAUCHERET; MALLORY; BARTEL, 2006), a família miR408 regula a expressão de genes que codificam fitocianinas e lacase (GAO et al., 2022); a família miR3508 regula a expressão de genes que codificam polifenol oxidases e pectinesterases (CHI et al., 2011; FIGUEREDO et al., 2020); e a família miR2118 atua na regulação de genes R, através da formação de siRNAs secundários endógenos (ARAKI et al., 2020).

No entanto, para outras famílias de miRNAs identificadas por homologia, os genes alvo divergiram de alvos relatados na literatura. O miR390 pode atuar na formação de siRNAs endógenos secundários (DE FELIPPES et al., 2017) ou na regulação de proteínas LRR-RLK (do inglês “Leucine-rich repeat receptor-like kinases”) (YIN et al., 2019), mas apresentou como alvo predito o gene ABNORMAL LEAF SHAPE 2 (ALE2), proteína RLK relacionada com comunicações intercelulares necessárias para funções de superfície da epiderme (TANAKA et al., 2007). Foi relatado que miR482 regula a expressão de genes NBS-LRR por meio da formação de siRNAs endógenos secundários (ZHU et al., 2013), porém apresentou o gene SINAT5 como alvo predito, o qual está relacionado com a via de sinalização de auxinas (XIE et al., 2002) e o controle do florescimento (PARK et al., 2010). O miR396 atua na regulação de fatores de transcrição GROWTH REGULATING FACTORS (GRFs) (LIEBSCH; PALATNIK, 2020), embora tenha apresentado como alvo predito uma proteína com ação regulatória que se liga à calmodulina. O miR1515 está relacionado à regulação de proteínas DCL (GAO et al., 2016), embora o alvo predito tenha sido proteína relacionada ao silenciamento gênico via mecanismos epigenéticos (ZHANG et al., 65

2019b). Foi relatado um gene que codifica uma proteína similar a glicoproteína rica em hidroxiprolina como alvo de miR862 (GU et al., 2010), embora o alvo predito tenha sido gene que codifica para proteína relacionada com a manutenção redox intracelular (SAPPL et al., 2009). O miR479 apresenta como alvo o gene NDH (LIU; SUN, 2017), que codifica para proteína relacionada com o transporte de elétrons na fase fotoquímica da fotossíntese (SHIKANAI, 2016), porém este miRNA apresentou como alvo predito provável CXE18, enzima hidrolítica relacionada com processos de crescimento e defesa contra patógenos (CAO et al., 2019). O miR2111 possui como alvo o gene TOO MUCH LOVE (TML), o qual codifica proteína F-box relacionada com a regulação da simbiose entre leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio (OKUMA et al., 2020), mas o alvo predito em *A. duranensis* é o gene TRANSMEMBRANE KINASE 4 (TMK4), que codifica proteína quinase relacionada com a sinalização de auxina (LI et al., 2021). Foi relatado que miR391 possui como alvos gene que codifica beta-frutofuranosidase (RAJAGOPALAN et al., 2006) e gene que codifica uma Ca²⁺-ATPase (ATTRI et al., 2022), embora tenha sido predito que atua na regulação de gene relacionado a mecanismos epigenéticos de controle da expressão gênica e miR5225 regula a expressão de gene que codifica Ca²⁺-ATPase (ZHU et al., 2022), porém não obtivemos alvos para esta família em *A. duranensis*.

Com relação aos 21 loci MIR identificados pelo processo de curadoria e não identificados por homologia com sequências presentes no miRbase, considerados miRNAs inéditos, não foram preditos alvos para dois destes (novo13 e novo 16), o que pode sugerir evolução recente destes loci. Os alvos preditos para os outros 19 miRNAs inéditos estão relacionados a diferentes processos celulares, como (i) a regulação da expressão gênica, no caso dos alvos dos miRNAs novo4, novo7, novo8, novo11 (fatores de transcrição) e novo20 (alvo relacionado a mecanismos de regulação epigenética) (BHATT et al., 2004; DOERKS; COPLEY; BORK, 2001; HEISLER et al., 2001; KANG et al., 2008; WEN; CHANG, 2002); (ii) regulação da atividade de proteínas, no caso dos alvos de novo3 (alvo relacionado à degradação de proteínas por ubiquitinação) (IÑIGO et al., 2012), novo5 (alvo é uma proteína que se liga à calmodulina) (GOLOVKIN; REDDY, 2003) e novo6 (alvo é uma quinase relacionada ao transporte de proteínas intracelular e ao processo de ETI) (TEH et al., 2015); (iii) regulação pós-transcricional, no caso do alvo de novo15, que está relacionado à transição entre a fase vegetativa e fase reprodutiva por alterações no processo

poli-adenilação de transcritos alvo (SCHOMBURG et al., 2001); (iv) controle da sinalização realizada por fitormônios, no caso dos alvos de novo8 (alvo é um fator de transcrição e regulador negativo da sinalização de giberelinas), novo9 (alvo é uma enzima relacionada ao catabolismo de citocininas) e novo 14 (alvo é uma enzima relacionada ao catabolismo de ácido abscísico por hidroxilação) (BARTRINA et al., 2011; UMEZAWA et al., 2006; WEN; CHANG, 2002); (v) metabolismo energético, no caso dos alvos de novo10 (alvo está relacionado à via das pentose fosfato) (YANG et al., 2019), novo12 (alvo está relacionado a biossíntese de aminoácidos) (SUNG et al., 2011) e novo21 (alvo está relacionado à biossíntese de amido) (LEI et al., 2022); (vi) resistência a infecção por patógenos, no caso de novo17 (alvo é proteína de resistência derivada de gene R) e novo19 (alvo é uma proteína relacionada ao transporte de vesículas intracelular) (KIM et al., 2022); (vii) lignificação, no caso do alvo de novo2 (ESCAMILLA-TREVIÑO et al., 2006).

A análise da expressão diferencial de loci MIR identificados em bibliotecas provenientes de amostras inoculadas com juvenis J2 de *M. arenaria*, em comparação com bibliotecas provenientes de amostras do tratamento controle, revelou alteração da expressão de cinco famílias de miRNAs conservados e um miRNA inédito.

Dentre os loci MIR diferencialmente expressos, observou-se que, em alguns casos, a alteração da expressão só foi constatada pelo programa mireap, embora o mesmo loci tenha sido identificado também pelo programa ShortStack, o que pode ser parcialmente explicado pela diferença entre as entradas fornecidas para a execução do ShortStack em cada situação. Também foi observado que, dentre os loci diferencialmente expressos de cada família, todos apresentaram a mesma alteração da expressão, isto é, não ocorreram diferenças na alteração da expressão entre loci pertencentes à mesma família. Esta uniformidade é esperada, embora também sejam constatadas situações em que loci pertencentes à mesma família são diferencialmente regulados (SINGROHA; SHARMA; SUNKUR, 2021).

Um locus pertencente à família conservada miR172 foi regulado para baixo mediante inoculação e o alvo predito para esta família são os genes RAP2.7 e AP2. Os membros da superfamília AP2/ERF são caracterizados pela presença de um ou mais domínios AP2 de ligação ao DNA em sua estrutura (MORAN et al., 2017; NOZAWA; MIURA; NEI, 2012; TAYLOR et al., 2014). Estes genes estão associados à via de sinalização do fitormônio etileno, sendo que a sua

transcrição é induzida por proteínas ETHYLENE INSENSITIVE (EIN) e ETHYLENE INSENSITIVE-LIKE (EIL) (CHANG et al., 2013; NAHAR et al., 2011). Foi relatada a importância da sinalização exercida por etileno e ácido jasmônico (JA) para a resistência de plantas de arroz a RKNs, com a sinalização do etileno responsável pela biossíntese de JA (Nahar et al., 2011). Além disso, foi demonstrado que a repressão da atividade regulatória de membros da família miR172 ou a expressão de derivações de seu gene-alvo (TOE1) resistentes à regulação pós-transcricional realizada por esta família de miRNA resultou na redução da formação de galhas e prejudicou o desenvolvimento de células gigantes de plantas de *A. thaliana* inoculadas com juvenis da espécie *Meloidogyne javanica* (DÍAZ-MANZANO et al., 2018). O fator de transcrição TOE1 é um regulador negativo da expressão da proteína FT (ZHANG et al., 2015), sendo que o módulo TOE1/FT está associado a diversos processos de desenvolvimento vegetal, como o controle do florescimento e o estabelecimento de nódulos em interações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio (WANG et al., 2014; ZHU; HELLIWELL, 2011). Também foi demonstrado que plantas de *A. thaliana* com mutações de perda de função da proteína FT apresentaram menor desenvolvimento de galhas e células gigantes mediante infecção com juvenis de *M. javanica*, o que indica o papel do módulo miR172/TOE1/FT na formação de células de alimentação desencadeada pela infecção de plantas por espécies de nematoides pertencentes ao grupo dos nematoides das galhas (DÍAZ-MANZANO et al., 2018). Em oposição ao observado em plantas de *A. thaliana* inoculadas com *M. javanica*, a superexpressão de miR172 em plantas de *Solanum lycopersicum* resultou em maior resistência a infecção pelo oomiceto *Phytophthora infestans*, com redução da formação de EROs, maior conteúdo de clorofila e aumento da taxa fotossintética, o que indica a complexidade da função regulatória exercida por membros desta família (LUAN et al., 2018). Deste modo, a repressão da expressão de loci pertencentes à família miR172 pode estar relacionada com um aumento da expressão de fatores de transcrição da superfamília AP2/ERF, os quais podem atuar na regulação da biossíntese de JA, na regulação da biossíntese de proteínas de defesa e na regulação da formação de células de alimentação de nematoides (mediante controle da expressão da proteína FT).

Três loci pertencentes à família conservada miR399 foram regulados para baixo mediante inoculação e o alvo predito para esta família é o gene UBC24. Este gene codifica proteína

relacionada à ubiquitinação e o módulo miR399-UBC24 é associado a respostas a condições de deficiência de fósforo e a baixas temperaturas (BARI et al., 2006; PENG et al., 2021). No caso de deficiência de fósforo, a expressão de miR399 leva à repressão de UBC24 e à ativação de proteínas transportadoras de fosfato que permitem tanto a remobilização intracelular de fósforo como o maior transporte do nutriente partindo de tecidos radiculares em direção à parte aérea (BARI et al., 2006). Em condições de estresse por baixa temperatura, a indução da expressão de miR399 resulta na repressão de UBC24 e na ativação de fator de transcrição da família DREB1 responsável pela indução de respostas celulares a tais condições (PENG et al., 2021). Além disso, genes que codificam proteínas R foram identificados como alvos de membros desta família e foi demonstrado que a infecção de plântulas de *Pyrus bretschneideri* pelo vírus ASPV induziu a expressão de miR399, embora não tenham sido constatadas diferenças na expressão do gene-alvo entre plântulas infectada e não infectadas (ZHANG et al., 2019a). Deste modo, a repressão de loci pertencentes à família miR399 mediante infecção por *M. arenaria* pode estar relacionada tanto à repressão do transporte de fósforo para a parte aérea, o que permitiria uma maior atividade metabólica em tecidos radiculares infectados, como à repressão da degradação de proteína ainda não identificada, como, por exemplo, proteína R relacionada ao processo de ETI, com regulação positiva a respostas de defesa a tais agentes patogênicos.

Um locus pertencente à família conservada miR408 foi regulado para baixo mediante inoculação e o alvo predito para esta família é o gene LAC, que codifica enzimas denominadas lacases. No apoplasto, estas enzimas utilizam diretamente O₂ para oxidar monolignóis e formar polímeros precursores de lignina (GAVNHOLT; LARSEN, 2002). Lacases também estão relacionadas à manutenção da estrutura e integridade de paredes celulares e polimerização de compostos fenólicos (JANUSZ et al., 2020; MA et al., 2011). O processo de lignificação está diretamente relacionado com a resistência a RKNs e a repressão de miR408 pode resultar em aumento da expressão desta enzima e estímulo à formação de lignina na parede celular de células infectadas e células vizinhas, além de incremento da formação de compostos antimicrobianos mediante reações entre compostos fenólicos.

Um locus pertencente à família conservada miR3508 foi regulado para baixo mediante inoculação e os alvos preditos para esta família são os genes PPO e PME13. O gene PPO codifica

polifenol oxidases, enzimas responsáveis pela oxidação de fenóis a quinonas (SULLIVAN, 2015), e o gene PME13 codifica proteína que inibe a hidrólise de pectinas, polissacarídeos componentes da parede celular (WU; BULGAKOV; JINN, 2018). A repressão de miR3508 mediante inoculação pode estar associada ao aumento da expressão destas enzimas, as quais estão relacionadas à formação de compostos tóxicos a patógenos e à manutenção da integridade da parede celular. Foi demonstrada a importância destas enzimas na resistência a diferentes agentes patogênicos.

Um locus pertencente à família conservada miR167 foi regulado para cima mediante inoculação e os alvos preditos para esta família são os genes NAC76 e ARF6. A partir da ligação de moléculas de auxina a proteínas receptoras, os fatores de transcrição da família ARF são liberados da repressão realizada por proteínas AUX/IAA e são capazes de induzir a expressão de genes responsivos a este fitormônio (NASEEM et al., 2015). A iniciação e formação de células gigantes estão associados a um acúmulo local de auxina, com a indução de genes responsáveis pela biossíntese e resposta a este fitormônio e repressão de reguladores negativos mediante infecção por nematoides (KARCZMAREK et al., 2004). A indução de miR167 pode estar relacionada com a repressão da via de sinalização de auxinas, de modo a impedir/retardar a formação de células gigantes, nas quais RKNs se estabelecem e das quais obtêm a alimentação necessária para o seu crescimento e reprodução.

O miRNA inédito Novo2 foi regulado para baixo mediante inoculação e o alvo predito para este miRNA é o gene responsável pela codificação da enzima Beta-glucosidase BoGHB3-like. Esta enzima está relacionada com a hidrólise de formas glicosiladas de monolignóis no apoplasto, precedendo as reações de polimerização responsáveis pela formação de lignina (ESCAMILLA-TREVIÑO et al., 2006). Deste modo, a repressão do miRNA Novo2 pode ser responsável pelo aumento da expressão desta enzima e a indução da lignificação, a qual é importante resposta celular contra infecções por RKNs.

Portanto, a partir da análise da expressão diferencial dos loci MIR identificados, é possível propor um modelo que explica a resposta de células de tecidos radiculares de *A. duranensis* à infecção por *M. arenaria*. Este modelo integra diferentes processos celulares, incluindo a alteração do balanço hormonal, com o aumento da expressão de fatores de transcrição relacionados à sinalização por etileno/biossíntese de ácido jasmônico e redução da expressão de

fatores de transcrição relacionados à sinalização de auxinas; redirecionamento do transporte de fósforo a sítios de elevada atividade metabólica (tecidos radiculares infectados); manutenção da integridade da parede celular e lignificação.

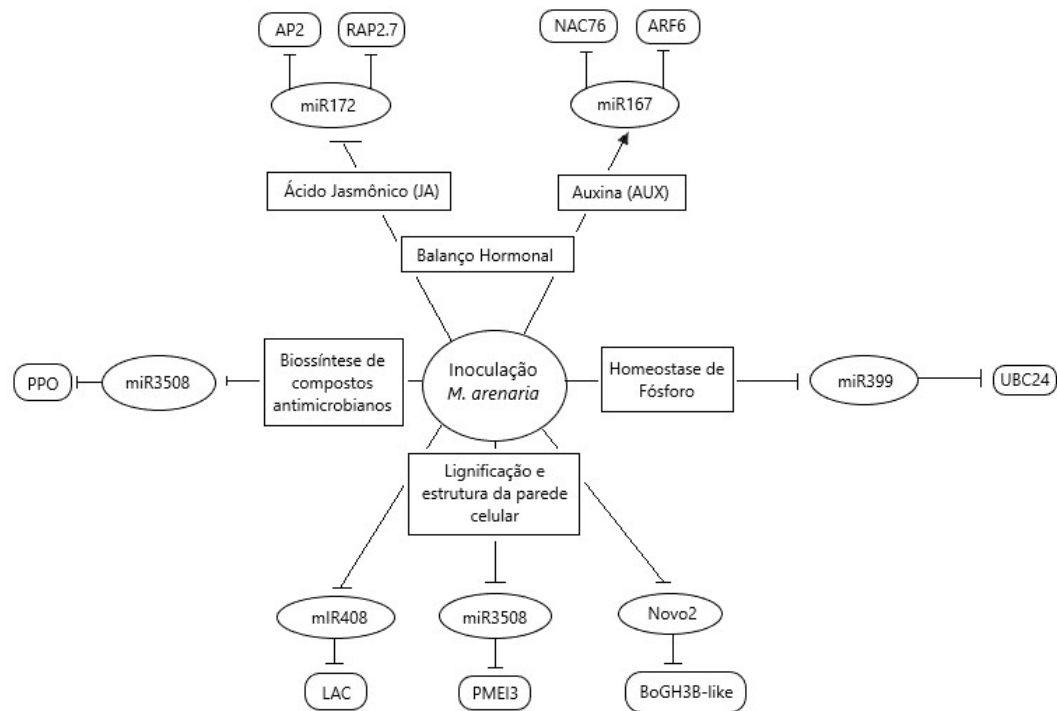


Figura 13: Modelo proposto para a resposta de células de tecidos radiculares de *A. duranensis* submetidas a inoculação por juvenis J2 da espécie *M. arenaria*.

A análise da expressão diferencial de loci MIR identificados em bibliotecas provenientes de amostras submetidas a déficit hídrico, em comparação com bibliotecas provenientes de amostras do tratamento controle, revelou alteração da expressão de 18 famílias de miRNAs conservados e 5 miRNAs inéditos, sendo a maioria reprimidos frente ao estresse. Dentre os loci MIR diferencialmente expressos, observou-se que, na maioria dos casos, a alteração da expressão foi identificada por ambos os programas preditores, o que é o esperado. Também foi observada a ocorrência de loci pertencentes à mesma família que apresentaram divergência na alteração da expressão, o que já foi constatado na literatura e pode ser explicado pela presença de diferentes elementos regulatórios em cis nos promotores destes loci. Esta divergência pode

resultar na regulação de diferentes alvos, além de alvos característicos de miRNAs conservados, e também pode acarretar alterações espaço-temporais na expressão de diferentes loci (ZHANG; WANG, 2016).

Seis loci pertencentes à família conservada miR166 foram regulados para baixo sob déficit hídrico e os alvos preditos para esta família são os genes HAT8, HAT14, HAT15 e REVOLUTA, os quais codificam para fatores de transcrição pertencentes à família HD-ZIP III (*Class III Homeodomain Leucine-Zipper*). Esta família de fatores de transcrição participa da regulação de processos relacionados ao crescimento e desenvolvimento, como a iniciação do meristema apical, a formação de tecidos vasculares, a determinação da polaridade de folhas e o desenvolvimento de raízes laterais (EMERY et al., 2003; MCCONNELL et al., 2001; OTSUGA et al., 2001). Foi demonstrado que a redução da atividade regulatória de loci pertencentes à família miR166, através da tecnologia STTM (Short Tandem Target Mimicry), em plantas de *A. thaliana*, resultou em aumento do conteúdo de ABA, via indução do gene BG1, e indução de genes responsivos ao ABA, via indução do gene que codifica para o fator de transcrição ABI4, sob condições livres de estresse hídrico. Além disso, foi demonstrado que ambos os genes são regulados por membros da família HD-ZIP III, os quais são alvos diretos de miR166 (YAN et al., 2016). Estes resultados relacionam a repressão de loci pertencentes à família conservada miR166 à regulação da biossíntese de ABA e a respostas relacionadas a via de sinalização de tal fitormônio.

Um locus pertencente à família conservada miR390 foi regulado para baixo sob déficit hídrico e o alvo predito para esta família é o gene ALE2, o qual codifica para proteína RLK relacionada à especificação da epiderme durante o período embrionário (JAVELLE et al., 2011). Foi demonstrado que a expressão de loci pertencentes à família miR390 induz a biogênese de tasiRNAs derivados do gene TAS3, os quais regulam a expressão dos genes ARF2, ARF3 e ARF4, os quais codificam para fatores de transcrição responsivos à sinalização realizada pelo fitormônio auxina. O aumento da concentração deste fitormônio em tecidos radiculares induz a expressão de loci pertencentes à família miR390, o que resulta na repressão da expressão dos fatores de transcrição ARF2, ARF3 e ARF4 e no conseqüente crescimento de raízes laterais (XIA; XU; MEYERS, 2017). Deste modo, a regulação para baixo de miR390 observada pode derivar de uma redução

da concentração de auxinas, ocasionada pela condição de déficit hídrico, e pode resultar na modulação da arquitetura radicular, favorecendo o crescimento da raiz primária, em detrimento do crescimento de raízes laterais, o que propicia a busca de água em camadas mais profundas do solo.

Seis loci pertencentes à família conservada miR172 foram regulados para baixo sob déficit hídrico e os alvos preditos para esta família são os genes RAP2.7 e AP2, ambos codificando para fatores de transcrição. Dentre os alvos identificados de miR172, encontra-se AP2 e genes que codificam proteínas similares a AP2 (*AP2-like*), os quais estão relacionados ao controle do período de florescimento (YANT et al., 2010). Foi demonstrado que, sob condições de déficit hídrico, a expressão de miR172 está relacionada à antecipação da época de florescimento, através da repressão da expressão de genes AP2-like, o que constitui forma de escape da seca, uma das estratégias adotadas por plantas para superar condições de déficit hídrico (HAN et al., 2013; LI et al., 2016). Também foi demonstrado que genes RAP2, os quais codificam para fatores de transcrição da família DREB2, atuam como repressores da expressão de genes responsivos a condições de seca relacionados a vias de sinalização independentes de ABA (DONG; LIU, 2010). Deste modo, a regulação para baixo de loci pertencentes à família miR172 observada, por um lado, se contrapõe à hipótese de indução do florescimento sob condições de déficit hídrico, e, do ponto de vista da regulação de genes ligados à via de sinalização independente de ABA, pode estar relacionada com um controle fino das respostas celulares a condições de estresse, as quais também podem impactar negativamente os processos de crescimento e desenvolvimento.

Três loci pertencentes à família conservada miR159 foram regulados para baixo, enquanto um locus pertencente a esta família foi regulado para cima. Os alvos preditos para esta família são genes que codificam para fatores de transcrição MYB. Em *A. thaliana* foi demonstrado que miR159 é induzido por ABA e está relacionado à repressão da expressão dos genes MYB33 e MYB101 (REYES; CHUA, 2007). Fatores de transcrição pertencentes à família MYB são capazes de se ligar a elementos regulatórios em cis presentes no promotor do gene RD22, o qual é responsivo a condições de déficit hídrico, e contribuem para aumento da tolerância a tais condições (ABE et al., 2003). Deste modo, (i) a observação da repressão e da indução de loci pertencentes a esta família indicam uma maior complexidade da regulação da expressão de tais

loci, o que pode envolver tanto elementos regulatórios em cis responsivos a fatores de transcrição relacionadas à via de sinalização dependente de ABA como outros elementos regulatórios em cis; e (ii) a repressão da maioria dos loci pertencentes à família miR159 pode estar relacionada com um incremento da expressão de fatores de transcrição MYB, os quais, por sua vez, são responsáveis pela indução de genes responsivos à seca.

Cinco loci pertencentes à família conservada miR171 foram regulados para baixo e os alvos preditos para esta família são genes que codificam fatores de transcrição pertencentes à família GRAS e subfamília SCR. Foi demonstrado o incremento da biossíntese de flavonoides em plantas de arroz, mediante incremento da expressão de miR171 por mecanismos não identificados (UM et al., 2022). Em *Malus domestica* (macieira), a inibição da expressão de miR171 ou a superexpressão de seu gene alvo resultou em incremento da tolerância a condições de déficit hídrico, através da indução da expressão da enzima MONODEHYDROASCORBATE REDUCTASE (MDHAR), relacionada com mecanismos enzimáticos de inativação de espécies reativas de oxigênio (CUI et al., 2014). Também foi demonstrado o papel de miR171 na regulação de genes da família GRAS relacionados à formação de nódulos com bactérias fixadoras de nitrogênio e com a regulação da biossíntese e sinalização de auxinas e giberelinas (ACHARD; GENSCHIK, 2009; GAO et al., 2004; SMIT et al., 2005). Deste modo, a regulação para baixo de loci pertencentes à família miR171 pode resultar no incremento da expressão de genes relacionados a diversas respostas adaptativas a condições de déficit hídrico, como a alteração da biossíntese e sinalização de fitormônios relacionados ao crescimento (auxinas e giberelinas), o estabelecimento de relações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio e a manutenção da homeostase redox intracelular.

Três loci pertencentes à família miR156 foram regulados para cima e os alvos preditos para esta família são genes que codificam fatores de transcrição da família SPL. O módulo miR156-SPL regula diversos processos relacionados ao crescimento e desenvolvimento de organismos vegetais, com destaque para a transição da estágio juvenil para o estágio adulto, no qual atua em conjunto com o módulo miR172-AP2-like. Na fase juvenil, a expressão de miR156 é elevada e, com o passar do tempo, sua expressão é progressivamente reduzida, o que resulta no acúmulo de fatores de transcrição SPL, que, por sua vez, induzem a expressão de loci

pertencentes à família miR172 e, conseqüentemente, acarreta na repressão de proteínas AP2-like, reguladores negativos da expressão da proteína FT (ANDRÉS; COUPLAND, 2012; MA et al., 2020a). Sob condições de déficit hídrico, dependendo do nível de estresse ao qual as plantas são submetidas, a progressão natural do desenvolvimento é interrompida, em favor do direcionamento de energia metabólica para respostas adaptativas às condições desfavoráveis predominantes. Foi demonstrado que, sob condições de déficit hídrico, miR156 é induzido, o que resulta na repressão da expressão de proteínas SPL e na indução da expressão de proteínas DIHYDROFLAVONOL-4-REDUCTASE (DFR), responsáveis pela biossíntese de antocianinas (CUI et al., 2014). Deste modo, a regulação para cima de loci pertencentes à família miR156 está de acordo com o que foi relatado pela literatura, e está relacionada a respostas adaptativas a condições de déficit hídrico mediante a biossíntese de antocianinas. Além disso, a regulação para baixo de loci pertencentes à família miR172 pode ser parcialmente explicada pela indução de miR156, através da interação entre os módulos regulatórios compostos por ambos miRNAs.

Dois loci pertencentes à família miR2111 foram regulados para cima e o alvo predito para esta família é o gene TMK4, que codifica para proteína RLK localizada na membrana plasmática (XU et al., 2014). Foi demonstrado que esta proteína atua como regulador negativo da sinalização dependente de ABA, através da fosforilação de ABI2, proteína pertencente à família PP2CA, a qual é responsável pela desfosforilação e inativação de proteínas quinase SnRK2 (BI et al., 2021). A regulação para cima de loci pertencentes à família miR2111 pode estar relacionada com a redução da expressão do gene TMK4 e conseqüente inativação do regulador negativo ABI2 através da formação de complexo com proteínas PYR mediante ligação de ABA a estas proteínas receptoras, o que contribui para a expressão de genes relacionados à via de sinalização dependente de ABA.

Um locus pertencente à família conservada miR482 foi regulado para baixo e o alvo predito para esta família é o gene SINAT5, o qual codifica para proteína com atividade de ubiquitina ligase capaz de induzir a degradação de proteínas alvo (ATTRI et al., 2022). Foi demonstrado que a proteína codificada por SINAT5 é capaz de promover a ubiquitinação e posterior degradação do fator de transcrição NAC1, o qual está relacionado à via de sinalização de auxinas e regula a formação de raízes laterais (XIE et al., 2000). Deste modo, a regulação para

baixo do locus pertencente à família miR482 pode estar relacionada à repressão do fator de transcrição NAC1 e, conseqüentemente, da formação de raízes laterais, favorecendo o direcionamento de fotoassimilados para o crescimento da raiz primária, o que permite a busca por água em camadas mais profundas do solo sob condições de déficit hídrico.

Um locus pertencente à família conservada miR862 foi regulado para baixo e o alvo predito para esta família é o gene GST1, que codifica para enzima relacionada à manutenção da homeostase redox intracelular através da conversão de peróxido de hidrogênio em água e da conjugação de subprodutos resultantes de processos de oxidação em formas oxidadas de glutathione (HASANUZZAMAN et al., 2019). Deste modo, a regulação para baixo do locus pertencente à família miR862 pode estar relacionada a respostas celulares adaptativas a condições de déficit hídrico que visam a manutenção da homeostase redox intracelular, por meio da inativação de EROs resultantes de tais condições e da conjugação de subprodutos da oxidação ocasionada pelo acúmulo de EROs.

Um locus pertencente à família conservada miR168 foi regulado para baixo e o alvo predito para esta família é o gene AGO1, o qual codifica para proteína responsável pela clivagem de mRNAs alvo mediante ligação entre o miRNA maduro e sítios complementares do mRNA alvo (REINHART et al., 2002). A regulação para baixo do locus pertencente à família miR168 pode indicar incremento da atividade regulatória de miRNAs sob condições de déficit hídrico.

Cinco loci pertencentes à família conservada miR399 foram regulados para baixo e o alvo predito para esta família é o gene UBC24. O módulo miR399-UBC24 está relacionado a respostas a condições de deficiência de fósforo, através da regulação da remobilização intracelular e da partição do nutriente entre diferentes tecidos (BARI et al., 2006), além de ser responsivo a condições de estresse por baixas temperaturas, regulando a via de sinalização independente de ABA (PENG et al., 2021). Foi demonstrado que esse módulo também é responsivo a condições de estresse por elevada salinidade, déficit hídrico e tratamento com ABA, porém exercendo efeitos contrastantes entre os diferentes tipos de estresse. Sob condições de estresse salino e tratamento com ABA, plantas com superexpressão de miR399 apresentaram tolerância a tais condições, enquanto sob condições de déficit hídrico, plantas superexpressando este miRNA apresentaram hipersensibilidade às condições prevalentes. Foi demonstrado que diversos genes

responsivos a ABA foram reprimidos e o gene ABF3, o qual codifica para fator de transcrição da família bZIP responsivo a ABA, foi sugerido como provável alvo de miR399 (PENG et al., 2021). Deste modo, a regulação para baixo de loci pertencentes à família miR399 observada pode estar relacionada à regulação de componentes da via de sinalização do fitormônio ABA sob condições de déficit hídrico.

Um locus pertencente à família conservada miR319 foi regulado para baixo e os alvos preditos para esta família são genes que codificam fatores de transcrição das famílias TCP e MYB. Foi demonstrado que a superexpressão do fator de transcrição codificado pelo gene TCP3, o qual é alvo de miR319, está associada a uma redução do transporte polar e sensibilidade a auxinas (LI; ZACHGO, 2013). Deste modo, a regulação para baixo do locus pertencente à família miR319 pode estar associada a uma regulação negativa da via de sinalização de auxinas, tanto pela redução do transporte polar como pela redução da expressão de genes responsivos a este fitormônio, o que reflete o direcionamento do metabolismo vegetal para processos adaptativos às condições desfavoráveis, em detrimento de processos de crescimento, sob condições de déficit hídrico.

Quatro loci pertencentes à família conservada miR167 foram regulados para baixo, enquanto um locus pertencente a esta família foi regulado para cima. Os alvos preditos para esta família são os genes NAC76 e ARF8. Foi demonstrado que plantas de *A. thaliana* com mutações nos genes ARF6 e ARF8 apresentaram maior desenvolvimento de raízes laterais que plantas controle, sob condições de déficit hídrico (KINOSHITA et al., 2012). O fator de transcrição codificado por ARF8 regula positivamente a expressão do gene GH3, o qual atua na inibição do desenvolvimento de raízes laterais (TEOTIA; MUKHERJEE; MISHRA, 2008). Deste modo, a regulação para baixo observada para a maioria dos loci pertencentes à família miR167 pode estar relacionada ao mecanismo de inibição do desenvolvimento de raízes laterais, favorecendo o desenvolvimento da raiz primária com o objetivo biológico de viabilizar a busca por água em camadas mais profundas do solo. Além disso, a proteína fosfolipase D (PLD), a qual está relacionada a respostas relacionadas à via de sinalização dependente de ABA (ZHANG et al., 2005), também é um alvo de miR167 e a repressão da expressão de miR167 foi relacionada ao acúmulo de transcritos de PLD em plantas de milho submetidas a condições de déficit hídrico (WEI et al., 2015).

Um locus pertencente à família conservada miR479 foi regulado para baixo e o alvo predito para esta família é o gene CXE18, o qual codifica para enzima capaz de hidrolisar ligações éster de cadeias de acila (RUI et al., 2022). Foi demonstrada a participação de carboxilesterases na destoxificação de herbicidas (WANG et al., 2017) e na via de sinalização de fitormônios (GRIFFITHS et al., 2006). Deste modo, a regulação para baixo do locus pertencente à família miR479 e a consequente regulação para cima do gene alvo putativo pode estar relacionada à participação da enzima induzida em algum processo biológico relacionado à adaptação à condição de déficit hídrico.

Um locus pertencente à família conservada miR391 foi regulado para baixo e o alvo predito para esta família é o gene HDAC2, o qual codifica para enzima responsável pela remoção de grupos acetila da cauda de histonas, resultando em repressão transcricional por alteração da estrutura da cromatina (HOLLENDER; LIU, 2008). A acetilação e desacetilação de histonas é um mecanismo de regulação da expressão gênica classificado como mecanismo epigenético, juntamente com a adição e remoção de grupos metila de elementos regulatórios em cis (LÄMKE; BÄURLE, 2017). A regulação para baixo do locus pertencente à família miR391 e a consequente indução da expressão de enzimas responsáveis pelo processo de desacetilação de histonas indicam a importância da regulação transcricional por mecanismos epigenéticos sob condições de déficit hídrico.

Um locus pertencente à família conservada miR162 foi regulado para baixo e o alvo predito para esta família é o gene DCL1, o qual codifica para proteína relacionada ao processo de biogênese de miRNAs (Wang et (WANG et al., 2019)al., 2019). A regulação para baixo do locus pertencente à família miR162, juntamente com a regulação para baixo do locus pertencente à família miR168, pode indicar um incremento da atividade regulatória de miRNAs sob condições de déficit hídrico.

O miRNA inédito Novo2 foi regulado para cima e o alvo predito para este miRNA é o gene que codifica a enzima Beta-glucosidase BoGH3-like. Beta-glucosidases são enzimas responsáveis pela remoção de resíduos glicosídicos terminais não redutores de moléculas glicosídicas (Cairns & Esen, 2010) e podem exercer diversas funções no metabolismo vegetal (DIETZ1 et al., 2000; ESCAMILLA-TREVIÑO et al., 2006; MORANT et al., 2008). Foi reportado que condições de estresse

por déficit hídrico podem induzir a lignificação de tecidos vegetais de acordo com o nível de estresse ao qual tais tecidos são submetidos (LEE et al., 2007; WEI et al., 2015). A observação de indução da expressão do miRNA inédito Novo2, o qual possui como alvo putativo uma proteína classificada como Beta-glucosidase, pode estar relacionada com outras funções exercidas por essa classe de enzimas, como alteração do balanço hormonal por hidrólise de formas conjugadas, por exemplo, ou pode ainda estar relacionada com a regulação de alvo não identificado na presente análise.

O miRNA inédito Novo14 foi regulado para baixo e o alvo predito para este miRNA é o gene CYP707A3, o qual codifica para enzima responsável pela hidroxilação de ABA e consequente regulação de níveis endógenos deste fitormônio (UMEZAWA et al., 2006). A hidroxilação é um dos principais mecanismos de catabolismo de ABA (NAMBARA; MARION-POLL, 2005) e a regulação para baixo do miRNA inédito Novo14 observada indica que, sob condições de déficit hídrico, os níveis endógenos deste fitormônio estão sujeitos a processos de regulação que integram tanto a promoção de sua biossíntese quanto o seu catabolismo.

O miRNA inédito Novo15 foi regulado para baixo e o alvo predito para este miRNA é o gene FPA. Foi reportado que a proteína codificada por este gene está relacionada à determinação da época de florescimento, uma vez que plantas com mutações que resultam em perda de função desta proteína apresentam florescimento tardio (SCHOMBURG et al., 2001). Subsequentemente, foi demonstrado que esta proteína atua na regulação dos processos de terminação da transcrição e poliadenilação e que plantas apresentando perda de função desta proteína apresentam fenótipos similares a plantas com mutações de perda de função em alelos do gene DCL1. Os autores explicaram esta similaridade de fenótipos com uma possível participação de proteínas DCL1 na regulação da formação de caudas poliadeniladas no final do processo de transcrição (DUC et al., 2013). Deste modo, a regulação para baixo do miRNA inédito Novo15 e a consequente indução da expressão do alvo putativo FPA podem indicar a mobilização de maquinaria celular relacionada à regulação da transcrição mediante a reprogramação transcricional causada pela condição de déficit hídrico.

O miRNA inédito Novo18 foi regulado para baixo e o alvo predito para este miRNA é o gene AGK2, o qual codifica para enzima quinase responsável pela transferência de fosfato

terminal de uma molécula de ATP para uma molécula de GMP ou dGMP, isto é, atuando na fosforilação de guaninas, etapa necessária para a biossíntese de ácidos nucleicos (KUMAR; SPANGENBERG; KONRAD, 2000). Deste modo, a regulação para baixo do miRNA inédito Novo18 e a consequente indução da expressão do alvo putativo AGK2 pode ser explicado por uma alteração no metabolismo de ácidos nucleicos ocasionada pela reprogramação transcricional derivada das condições de déficit hídrico.

O miRNA inédito Novo19 foi regulado para baixo e o alvo predito para este miRNA é o gene SYT5, o qual codifica para proteína responsável pela homeostase de diacilglicerol na interface entre a membrana plasmática e o retículo endoplasmático sob condições de estresse (RUIZ-LOPEZ et al., 2021). A formação de moléculas lipídicas com ação regulatória, como ácido fosfatídico, é recorrente sob condições de estresse abiótico e ocorre através da hidrólise de fosfolipídeos estruturais por lipases, com a formação de diacilglicerol, o qual é, subsequentemente, fosforilado por proteínas quinase (MUNNIK; TESTERINK, 2009). A concentração de diacilglicerol nas proximidades da membrana plasmática deve ser altamente controlada, uma vez que altas concentrações de diacilglicerol são capazes de danificar a estrutura lamelar da membrana (CAMPOMANES; ZONI; VANNI, 2019). As sinaptotagminas são proteínas ancoradas na membrana do retículo endoplasmático capazes de manter a homeostase de diacilglicerol através do transporte deste composto (RUIZ-LOPEZ et al., 2021). Deste modo, a regulação para baixo do miRNA inédito Novo19 e a consequente indução da expressão da proteína SYT5, sob condições de estresse hídrico, pode estar relacionada com a formação de lipídeos de sinalização relacionados à via de sinalização dependente de ABA e a consequente necessidade de manutenção da homeostase de diacilglicerol formado nas proximidades da membrana.

Portanto, foi proposto modelo que descreve as respostas, a nível de miRNAs, de células que compõe tecidos radiculares de *A. duranensis* a condições de déficit hídrico, englobando loci diferencialmente expressos, seus respectivos genes alvo e os processos celulares/vias metabólicas com os quais estão relacionados (Figura 14). Dentre os principais processos/vias impactados pela seca, destacam-se vias de sinalização relacionadas aos fitormônios ABA (ácido abscísico) e AUX (auxina) e a via de sinalização independente de ABA, relacionada a fatores de

transcrição DREB2. Os miRNAs diferencialmente expressos relacionados a tais vias de sinalização podem regular diretamente a expressão de seus componentes, regular a expressão de proteínas que exercem ação sobre seus componentes e regular a expressão de proteínas associadas à homeostase de mensageiros secundários de tais vias, através de modificações pós-traducionais, por exemplo. De modo geral, foi observada a indução da expressão de componentes das vias de sinalização dependente e independente de ABA (ou repressão de reguladores negativos) e repressão da expressão de componentes da via de sinalização de auxinas (ou indução da expressão de reguladores negativos). Além de vias de sinalização de fitormônios, também foi constatada a expressão diferencial de miRNAs relacionados à (i) homeostase redox intracelular, através do controle da expressão de enzimas antioxidantes e da biossíntese de flavonoides; (ii) processos relacionados à regulação da expressão gênica, como acetilação/desacetilação de caudas de histonas e poliadenilação de pre-mRNAs; (iii) biossíntese de ácidos nucleicos e (iv) biogênese e atividade de miRNAs.

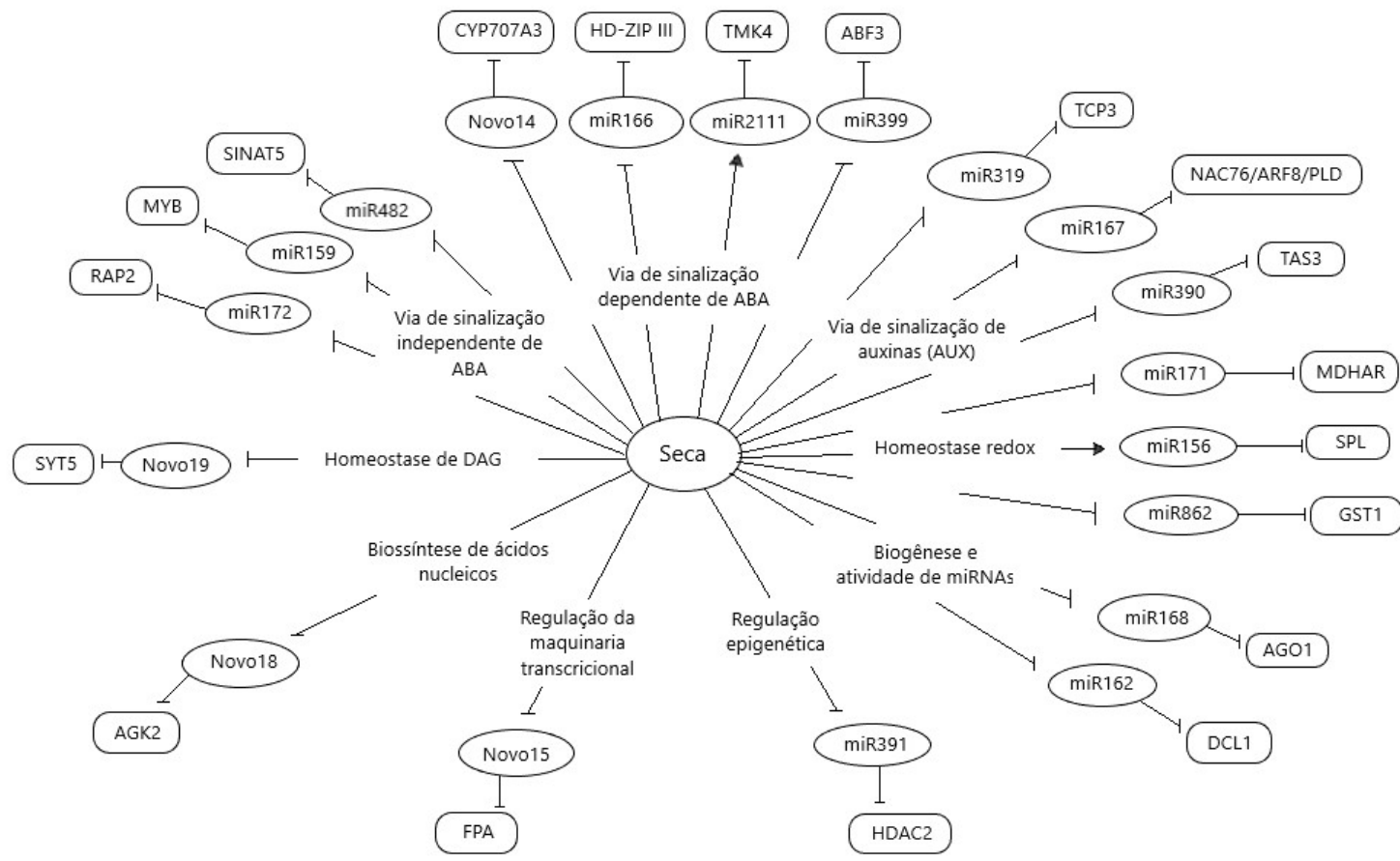


Figura 14: Modelo proposto para respostas de células de tecidos radiculares de *A. duranensis* submetidas a condições de deficit hídrico.

6 Conclusões

- A utilização conjunta de ShortStack (identificação de loci MIR, anotação de loci MIR e contagem de número de reads) e mireap (identificação de loci MIR), no âmbito do pipeline de análise bioinformática desenvolvido pelo LBI/CENARGEN, apresentou resultados satisfatórios e revelou sinergia entre os pontos fortes de cada programa;

- A partir da análise realizada no presente trabalho, foi possível identificar loci MIR presentes no genoma de referência da espécie *A. duranensis*, além de verificar loci diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico e inoculação com juvenis J2 da espécie *M. arenaria*.

- A análise da expressão diferencial de loci MIR apresentou, de modo geral, concordância entre os resultados obtidos somente com o ShortStack e o ShortStack com agrupamento do mireap para amostras de tecidos radiculares de plantas submetidas a condições de déficit hídrico, porém divergências foram observadas entre os resultados obtidos para amostras de tecidos radiculares de plantas inoculadas com juvenis J2 da espécie *M. arenaria*, o que deve ser investigado com maior profundidade em etapas posteriores;

- Dentre os loci identificados, a maioria pertence a famílias de miRNAs conservados em espécies vegetais. Também foram identificados miRNAs inéditos que, provavelmente, são espécie específicos.

- Sob inoculação com juvenis J2 de *M. arenaria*, as principais vias metabólicas moduladas estão relacionadas à regulação do balanço hormonal, homeostase de fósforo e lignificação/estrutura de paredes celulares;

- Sob condições de déficit hídrico, as principais vias metabólicas moduladas estão relacionadas a vias de sinalização hormonal, homeostase redox intracelular, regulação da biogênese e atividade de miRNAs e regulação da maquinaria celular associada à expressão gênica.- A identificação de genes diferencialmente expressos sob condições de estresse biótico e abiótico, juntamente com as vias metabólicas relacionadas a tais genes e os mecanismos regulatórios responsáveis por sua expressão, é fundamental para aprofundar o conhecimento sobre respostas vegetais a tais condições em diferentes níveis (celular, bioquímico e fisiológico).

Além disso, os resultados provenientes deste trabalho podem servir como base para aplicações biotecnológicas com utilização tanto em pesquisa básica como em pesquisa aplicada, como, por exemplo, o estudo de genômica funcional e a criação de variedades com tolerância/resistência.

7 Perspectivas

No que diz respeito às próximas etapas no estudo de miRNAs responsivos a condições de estresse biótico e abiótico em *A. duranensis*, os seguintes procedimentos são propostos: confirmação da alteração da expressão dos loci MIR diferencialmente expressos e de seus respectivos genes alvo por qRT-PCR; análise de elementos regulatórios em cis de promotores dos loci identificados; repetição do experimento com a análise de amostras coletadas em diferentes momentos após a aplicação do estresse e/ou amostras provenientes de diferentes tecidos.

As informações geradas pelo presente trabalho derivam da análise bioinformática de dados provenientes do sequenciamento de amostras de tecidos radiculares e necessitam de confirmação por meio de experimentos de qRT-PCR, os quais, idealmente, devem analisar a expressão dos miRNAs diferencialmente expressos e de seus respectivos genes alvo.

A análise de elementos regulatórios em cis de promotores dos loci identificados pode explicar divergências entre a expressão de loci pertencentes a diferentes famílias, assim como explicar a divergências entre a expressão de loci pertencentes à mesma família. Esta análise pode ser útil no estabelecimento de relações de causa e efeito, como a indução da expressão de determinado locus/loci por fitormônios, por determinada família de fator de transcrição ou em determinado tecido vegetal.

A repetição do experimento com a análise de amostras coletadas em diferentes momentos após a aplicação do estresse pode revelar a dinâmica de expressão de diferentes famílias de miRNAs, assim como diferenças entre membros da mesma família ao longo do tempo. O presente trabalho analisou apenas amostras de tecidos radiculares e seria interessante também analisar amostras provenientes de outros tecidos, como, por exemplo, tecidos foliares, uma vez que a regulação da expressão de miRNAs pode diferir entre tecidos.

8 Referências Bibliográficas

ABAD, P. et al. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. **Molecular plant pathology**, v. 4, n. 4, p. 217–224, jul. 2003.

ABE, H. et al. Role of arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. **The Plant cell**, v. 9, n. 10, p. 1859–1868, 1997.

ABE, H. et al. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. **The Plant cell**, v. 15, n. 1, p. 63–78, 1 jan. 2003.

ACHARD, P.; GENSHIK, P. Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 4, p. 1085–1092, 1 mar. 2009.

ADACHI, H.; DEREVNINA, L.; KAMOUN, S. NLR singletons, pairs, and networks: evolution, assembly, and regulation of the intracellular immunoreceptor circuitry of plants. **Current opinion in plant biology**, v. 50, p. 121–131, 1 ago. 2019.

ADENOT, X. et al. DRB4-dependent TAS3 trans-acting siRNAs control leaf morphology through AGO7. **Current biology : CB**, v. 16, n. 9, p. 927–932, 9 maio 2006.

ALLEN, E. et al. microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. **Cell**, v. 121, n. 2, p. 207–221, 22 abr. 2005.

ALONSO-PERAL, M. M. et al. The microRNA159-regulated GAMYB-like genes inhibit growth and promote programmed cell death in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 154, n. 2, p. 757–771, 2010.

AMBROS, V. et al. A uniform system for microRNA annotation. **RNA**, v. 9, n. 3, p. 277–279, 1 mar. 2003.

ANDRÉS, F.; COUPLAND, G. The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 9, p. 627–639, set. 2012.

ARAKI, S. et al. miR2118-dependent U-rich phasiRNA production in rice anther wall development. **Nature Communications 2020 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 19 jun. 2020.

ARENAS-HUERTERO, C. et al. Conserved and novel miRNAs in the legume *Phaseolus vulgaris* in response to stress. **Plant molecular biology**, v. 70, n. 4, p. 385–401, jul. 2009.

ARIEL, F. et al. Battles and hijacks: noncoding transcription in plants. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 6, p. 362–371, 1 jun. 2015.

ATTRI, K. et al. Rapid sequence and functional diversification of a miRNA superfamily targeting calcium signaling components in seed plants. **New Phytologist**, v. 235, n. 3, p. 1082–1095, 1 ago. 2022.

AXTELL, M. J. Classification and comparison of small RNAs from plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 137–159, abr. 2013.

AXTELL, M. J.; BOWMAN, J. L. Evolution of plant microRNAs and their targets. **Trends in plant science**, v. 13, n. 7, p. 343–349, jul. 2008.

AXTELL, M. J.; MEYERS, B. C. Revisiting Criteria for Plant MicroRNA Annotation in the Era of Big Data. **The Plant cell**, v. 30, n. 2, p. 272–284, 1 fev. 2018.

BARBARY, A. et al. Host genetic resistance to root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., in Solanaceae: from genes to the field. **Pest Management Science**, v. 71, n. 12, p. 1591–1598, 1 dez. 2015.

BARI, R. et al. PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. **Plant physiology**, v. 141, n. 3, p. 988–999, 2006.

BARRANGOU, R. et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 315, n. 5819, p. 1709–1712, 23 mar. 2007.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281–297, 23 jan. 2004.

BARTRINA, I. et al. Cytokinin Regulates the Activity of Reproductive Meristems, Flower Organ Size, Ovule Formation, and Thus Seed Yield in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell**, v. 23, n. 1, p. 69, 2011.

BERNSTEIN, E. et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**, v. 409, n. 6818, p. 363–366, 18 jan. 2001.

BERTIOLI, D. J. et al. An overview of peanut and its wild relatives. **Plant Genetic Resources**, v. 9, n. 1, p. 134–149, abr. 2011.

BERTIOLI, D. J. et al. The genome sequences of *Arachis duranensis* and *Arachis ipaensis*, the diploid ancestors of cultivated peanut. **Nature Genetics** 2016 48:4, v. 48, n. 4, p. 438–446, 22
87

fev. 2016.

BERTIOLI, D. J. et al. The genome sequence of segmental allotetraploid peanut *Arachis hypogaea*. **Nature Genetics** **2019 51:5**, v. 51, n. 5, p. 877–884, 1 maio 2019.

BHATT, A. M. et al. Gene structure and molecular analysis of *Arabidopsis thaliana* ALWAYS EARLY homologs. **Gene**, v. 336, n. 2, p. 219–229, 21 jul. 2004.

BHOGIREDDY, S. et al. Regulatory non-coding RNAs: a new frontier in regulation of plant biology. **Functional & Integrative Genomics** **2021 21:3**, v. 21, n. 3, p. 313–330, 20 maio 2021.

BI, G. et al. Receptor-Like Cytoplasmic Kinases Directly Link Diverse Pattern Recognition Receptors to the Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 30, n. 7, p. 1543–1561, 10 ago. 2018.

BI, G. et al. The ZAR1 resistosome is a calcium-permeable channel triggering plant immune signaling. **Cell**, v. 184, n. 13, p. 3528–3541.e12, 24 jun. 2021.

BIGEARD, J.; COLCOMBET, J.; HIRT, H. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). **Molecular plant**, v. 8, n. 4, p. 521–539, 6 abr. 2015.

BONARDI, V. et al. A new eye on NLR proteins: focused on clarity or diffused by complexity? **Current opinion in immunology**, v. 24, n. 1, p. 41, fev. 2012.

BORGES, F.; MARTIENSSSEN, R. A. The expanding world of small RNAs in plants. **Nature Publishing Group**, 2015.

BORSANI, O. et al. Endogenous siRNAs Derived from a Pair of Natural cis-Antisense Transcripts Regulate Salt Tolerance in *Arabidopsis*. **Cell**, v. 123, n. 7, p. 1279, 29 dez. 2005.

BOUDSOCQ, M.; BARBIER-BRYGOO, H.; LAURIÈRE, C. Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 40, p. 41758–41766, 1 out. 2004.

BOUTROT, F.; ZIPFEL, C. Function, Discovery, and Exploitation of Plant Pattern Recognition Receptors for Broad-Spectrum Disease Resistance. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120106>, v. 55, p. 257–286, 4 ago. 2017.

BRASILEIRO, A. C. M. et al. Transcriptome Profiling of Wild *Arachis* from Water-Limited Environments Uncovers Drought Tolerance Candidate Genes. **Plant Molecular Biology Reporter**, 88

v. 33, n. 6, p. 1876–1892, 1 dez. 2015.

BRAY, E. A. Plant Response to Water-deficit Stress. **eLS**, 16 jul. 2007.

BRENNER, S.; JACOB, F.; MESELSON, M. An Unstable Intermediate Carrying Information from Genes to Ribosomes for Protein Synthesis. **Nature** **1961** **190:4776**, v. 190, n. 4776, p. 576–581, 1961.

BROCARD, I. M.; LYNCH, T. J.; FINKELSTEIN, R. R. Regulation and Role of the Arabidopsis Abscisic Acid-Insensitive 5 Gene in Abscisic Acid, Sugar, and Stress Response. **Plant Physiology**, v. 129, n. 4, p. 1533, 2 ago. 2002.

BRODERSEN, P. et al. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. **Science (New York, N.Y.)**, v. 320, n. 5880, p. 1185–1190, 30 maio 2008.

BROWN, M. et al. Munich Personal RePEc Archive Climate Change, Global Food Security and the U.S. Food System. 2015.

BUTCHER, S. E.; BROW, D. A. Towards understanding the catalytic core structure of the spliceosome. **Biochemical Society transactions**, v. 33, n. Pt 3, p. 447–449, jun. 2005.

CAIRNS, J. E. et al. Effect of soil mechanical impedance on root growth of two rice varieties under field drought stress. **Plant and Soil**, v. 267, n. 1–2, p. 309–318, 1 dez. 2004.

CAMPOMANES, P.; ZONI, V.; VANNI, S. Local accumulation of diacylglycerol alters membrane properties nonlinearly due to its transbilayer activity. **Communications Chemistry** **2019** **2:1**, v. 2, n. 1, p. 1–8, 25 jun. 2019.

CAO, X. et al. Genome-Wide Identification and Functional Analysis of Carboxylesterase and Methylsterase Gene Families in Peach (*Prunus persica* L. Batsch). **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1511, 22 nov. 2019.

CAO, Y. et al. The kinase LYK5 is a major chitin receptor in Arabidopsis and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1. **eLife**, v. 3, 2014.

CARBONELL, A. et al. Functional Analysis of Three Arabidopsis ARGONAUTES Using Slicer-Defective Mutants. **The Plant Cell**, v. 24, n. 9, p. 3613–3629, 24 out. 2012.

CASAL, J. J.; BALASUBRAMANIAN, S. Thermomorphogenesis. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-095919>, v. 70, p. 321–346, 29 abr. 2019.

CHAKRABARTI, M. et al. Wide-ranging transcriptome remodelling mediated by alternative

polyadenylation in response to abiotic stresses in Sorghum. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 102, n. 5, p. 916–930, 1 jun. 2020.

CHAN, K. X. et al. Learning the Languages of the Chloroplast: Retrograde Signaling and Beyond. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111854>, v. 67, p. 25–53, 29 abr. 2016.

CHANG, K. N. et al. Temporal transcriptional response to ethylene gas drives growth hormone cross-regulation in Arabidopsis. **eLife**, v. 2, n. 2, 11 jun. 2013.

CHANG, Y. N. et al. Epigenetic regulation in plant abiotic stress responses. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 62, n. 5, p. 563–580, 1 maio 2020.

CHEKANOVA, J. A. Long non-coding RNAs and their functions in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 27, p. 207–216, 1 out. 2015.

CHEN, H. et al. Roles of arabidopsis WRKY18, WRKY40 and WRKY60 transcription factors in plant responses to abscisic acid and abiotic stress. **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 19 dez. 2010a.

CHEN, H. M. et al. 22-Nucleotide RNAs trigger secondary siRNA biogenesis in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 34, p. 15269–15274, 24 ago. 2010b.

CHEN, P.; TSAY, T. T. Effect of Crop Rotation on *Meloidogyne* spp. and *Pratylenchus* spp. Populations in Strawberry Fields in Taiwan. **Journal of Nematology**, v. 38, n. 3, p. 339, set. 2006.

CHEN, X. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. **Science (New York, N.Y.)**, v. 303, n. 5666, p. 2022–2025, 26 mar. 2004.

CHEN, X. et al. WRKY transcription factors: evolution, binding, and action. **Phytopathology Research 2019 1:1**, v. 1, n. 1, p. 1–15, 16 abr. 2019.

CHENG, M. C. et al. Arabidopsis RGLG2, functioning as a RING E3 ligase, interacts with AtERF53 and negatively regulates the plant drought stress response. **Plant physiology**, v. 158, n. 1, p. 363–375, 2012.

CHI, X. et al. Identification and Characterization of microRNAs from Peanut (*Arachis hypogaea* L.) by High-Throughput Sequencing. **PLOS ONE**, v. 6, n. 11, p. e27530, 16 nov. 2011.

CHINCHILLA, D. et al. The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines

the specificity of flagellin perception. **The Plant cell**, v. 18, n. 2, p. 465–476, 2006.

CHOE, A. et al. Ascaroside signaling is widely conserved among nematodes. **Current biology : CB**, v. 22, n. 9, p. 772–780, 8 maio 2012.

CHOUDHARY, J. S.; KUMARI, M.; FAND, B. B. Linking insect pest models with climate change scenarios to project against future risks of agricultural insect pests. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 14, n. 55, 2019.

CLAVERIE, M. et al. The Ma Gene for Complete-Spectrum Resistance to Meloidogyne Species in Prunus Is a TNL with a Huge Repeated C-Terminal Post-LRR Region. **Plant Physiology**, v. 156, n. 2, p. 779, 2011.

COLLIER, S. M.; MOFFETT, P. NB-LRRs work a “bait and switch” on pathogens. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 10, p. 521–529, 1 out. 2009.

CRAMER, G. R. Abiotic stress and plant responses from the whole vine to the genes. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 16, n. SUPPL. 1, p. 86–93, jan. 2010.

CUI, L. G. et al. The miR156-SPL9-DFR pathway coordinates the relationship between development and abiotic stress tolerance in plants. **The Plant Journal**, v. 80, n. 6, p. 1108–1117, 1 dez. 2014.

DAI, X.; ZHUANG, Z.; ZHAO, P. X. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release). **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W49–W54, 2 jul. 2018.

DANGL, J. L.; MCDOWELL, J. M. Two modes of pathogen recognition by plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 23, p. 8575–8576, 6 jun. 2006.

DAXINGER, L. et al. A stepwise pathway for biogenesis of 24-nt secondary siRNAs and spreading of DNA methylation. **EMBO Journal**, v. 28, n. 1, p. 48–57, 7 jan. 2009.

DE CARVALHO MORETZSOHN, M. et al. Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. **BMC Plant Biology**, v. 4, n. 1, p. 1–10, 14 jul. 2004.

DE FELIPPES, F. F. et al. A single miR390 targeting event is sufficient for triggering TAS3-tasiRNA biogenesis in Arabidopsis. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 9, p. 5539, 5 maio 2017.

DESAEGER, J.; DICKSON, D. W.; LOCASCIO, S. J. Methyl Bromide Alternatives for Control of Root-knot Nematode (*Meloidogyne* spp.) in Tomato Production in Florida. **Journal of nematology**, v. 49, n. 2, p. 140–149, 1 jun. 2017.

DHARMASIRI, N. et al. Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. **Developmental cell**, v. 9, n. 1, p. 109–119, jul. 2005.

DÍAZ-MANZANO, F. E. et al. A role for the gene regulatory module miRNA172/TOE1/FT in the feeding sites induced by *Meloidogyne javanica* in Arabidopsis. **The New phytologist**, v. 217, n. 2, p. 813, 1 jan. 2018.

DIETZ1, K.-J. et al. Extracellular β -glucosidase activity in barley involved in the hydrolysis of ABA glucose conjugate in leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 346, p. 937–944, 1 maio 2000.

DING, F. et al. Genome-wide analysis of alternative splicing of pre-mRNA under salt stress in Arabidopsis. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, 4 jun. 2014.

DING, Y. et al. microRNAs involved in auxin signalling modulate male sterility under high-temperature stress in cotton (*Gossypium hirsutum*). **The Plant Journal**, v. 91, n. 6, p. 977–994, 1 set. 2017.

DOERKS, T.; COPLEY, R.; BORK, P. DDT - A novel domain in different transcription and chromosome remodeling factors. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 26, n. 3, p. 145–146, 1 mar. 2001.

DOI, N. et al. Short-Interfering-RNA-Mediated Gene Silencing in Mammalian Cells Requires Dicer and eIF2C Translation Initiation Factors. **Current Biology**, v. 13, n. 1, p. 41–46, 8 jan. 2003.

DONG, C. J.; LIU, J. Y. The Arabidopsis EAR-motif-containing protein RAP2.1 functions as an active transcriptional repressor to keep stress responses under tight control. **BMC Plant Biology**, v. 10, p. 47, 16 abr. 2010.

DUC, C. et al. Transcription Termination and Chimeric RNA Formation Controlled by Arabidopsis thaliana FPA. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 10, out. 2013.

EAMENS, A. L. et al. The Arabidopsis thaliana double-stranded RNA binding protein DRB1 directs guide strand selection from microRNA duplexes. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 15, n. 12, p. 92

2219–2235, dez. 2009.

EMERY, J. F. et al. Radial Patterning of Arabidopsis Shoots by Class III HD-ZIP and KANADI Genes. **Current Biology**, v. 13, n. 20, p. 1768–1774, 14 out. 2003.

ESCAMILLA-TREVIÑO, L. L. et al. Arabidopsis thaliana β -Glucosidases BGLU45 and BGLU46 hydrolyse monolignol glucosides. **Phytochemistry**, v. 67, n. 15, p. 1651–1660, 1 ago. 2006.

FAHLGREN, N. et al. Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR3 by TAS3 ta-siRNA affects developmental timing and patterning in Arabidopsis. **Current biology : CB**, v. 16, n. 9, p. 939–944, 9 maio 2006.

FANG, X. et al. Transcription and processing of primary microRNAs are coupled by Elongator complex in Arabidopsis. **Nature plants**, v. 1, n. 6, jun. 2015.

FANG, Y.; XIONG, L. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences 2014 72:4**, v. 72, n. 4, p. 673–689, 22 out. 2014.

FAROOQ, M. et al. Physiological Role of Exogenously Applied Glycinebetaine to Improve Drought Tolerance in Fine Grain Aromatic Rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 194, n. 5, p. 325–333, 1 out. 2008.

FAVERY, B. et al. Gall-forming root-knot nematodes hijack key plant cellular functions to induce multinucleate and hypertrophied feeding cells. **Journal of Insect Physiology**, v. 84, p. 60–69, 1 jan. 2016.

FEI, Q.; XIA, R.; MEYERS, B. C. Phased, Secondary, Small Interfering RNAs in Posttranscriptional Regulatory Networks. **The Plant Cell**, v. 25, n. 7, p. 2400–2415, 26 ago. 2013.

FENG, C. Z. et al. Arabidopsis RAV1 transcription factor, phosphorylated by SnRK2 kinases, regulates the expression of ABI3, ABI4, and ABI5 during seed germination and early seedling development. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 80, n. 4, p. 654–668, 1 nov. 2014.

FENG, J. X. et al. An Annotation Update via cDNA Sequence Analysis and Comprehensive Profiling of Developmental, Hormonal or Environmental Responsiveness of the Arabidopsis AP2/EREBP Transcription Factor Gene Family. **Plant Molecular Biology 2005 59:6**, v. 59, n. 6, p. 853–868, dez. 2005.

FERRIS, H. et al. Reflections on Plant and Soil Nematode Ecology: Past, Present and Future. **Journal of Nematology**, v. 44, n. 2, p. 115, jun. 2012.

FIGUEREDO, M. S. et al. Identification of miRNAs linked to peanut nodule functional processes. **Journal of Biosciences**, v. 45, n. 1, 1 dez. 2020.

FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature** **1998 391:6669**, v. 391, n. 6669, p. 806–811, 19 fev. 1998.

FUJII, H. et al. In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. **Nature**, v. 462, n. 7273, p. 660–664, 3 dez. 2009.

FUJII, H.; VERSLUES, P. E.; ZHU, J. K. Arabidopsis decuple mutant reveals the importance of SnRK2 kinases in osmotic stress responses in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 4, p. 1717–1722, 25 jan. 2011.

FUJIOKA, Y. et al. Location of a Possible miRNA Processing Site in SmD3/SmB Nuclear Bodies in Arabidopsis. **Plant and Cell Physiology**, v. 48, n. 9, p. 1243–1253, 1 set. 2007.

FUJITA, Y. et al. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. **Journal of Plant Research** **2011 124:4**, v. 124, n. 4, p. 509–525, 18 mar. 2011.

FUJITA, Y.; YOSHIDA, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Pivotal role of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in ABRE-mediated transcription in response to osmotic stress in plants. **Physiologia plantarum**, v. 147, n. 1, p. 15–27, jan. 2013.

GANDIKOTA, M. et al. The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the Arabidopsis SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 49, n. 4, p. 683–693, fev. 2007.

GAO, F. et al. Identification of drought-responsive microRNAs and their targets in *Ammopiptanthus mongolicus* by using high-throughput sequencing. **Scientific Reports** **2016 6:1**, v. 6, n. 1, p. 1–16, 4 out. 2016.

GAO, M. J. et al. An auxin-responsive SCARECROW-like transcriptional activator interacts with histone deacetylase. **Plant Molecular Biology**, v. 55, n. 3, p. 417–431, 2004.

GAO, X. et al. Bifurcation of Arabidopsis NLR Immune Signaling via Ca²⁺-Dependent Protein Kinases. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 1, p. 1003127, jan. 2013.

GAO, Y. et al. The Evolution and Functional Roles of miR408 and Its Targets in Plants.

International Journal of Molecular Sciences, v. 23, n. 1, p. 530, 1 jan. 2022.

GAVNHOLT, B.; LARSEN, K. Molecular biology of plant laccases in relation to lignin formation. **Physiologia Plantarum**, v. 116, n. 3, p. 273–280, 1 nov. 2002.

GENG, Z. et al. A Conserved miR394-Targeted F-Box Gene Positively Regulates Drought Resistance in Foxtail Millet. **Journal of Plant Biology** **2021 64:3**, v. 64, n. 3, p. 243–252, 1 mar. 2021.

GILROY, S.; TREWAVAS, A. Signal processing and transduction in plant cells: The end of the beginning? **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 4, p. 307–314, abr. 2001.

GOLOVKIN, M.; REDDY, A. S. N. A calmodulin-binding protein from Arabidopsis has an essential role in pollen germination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 18, p. 10558, 9 set. 2003.

GOTTESMAN, S. Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. **Trends in genetics : TIG**, v. 21, n. 7, p. 399–404, jul. 2005.

GRIFFITHS, J. et al. Genetic Characterization and Functional Analysis of the GID1 Gibberellin Receptors in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 18, n. 12, p. 3399–3414, 1 dez. 2006.

GRUBER, A. R.; BERNHART, S. H.; LORENZ, R. The viennaRNA web services. **Methods in Molecular Biology**, v. 1269, p. 307–326, 2015.

GU, M. et al. Expression analysis suggests potential roles of microRNAs for phosphate and arbuscular mycorrhizal signaling in *Solanum lycopersicum*. **Physiologia Plantarum**, v. 138, n. 2, p. 226–237, 1 fev. 2010.

GUIMARÃES, P. M. et al. Global transcriptome analysis of two wild relatives of peanut under drought and fungi infection. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 1–15, 13 ago. 2012.

GUO, H. S. et al. MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for arabidopsis lateral root development. **The Plant cell**, v. 17, n. 5, p. 1376–1386, 2005.

GUO, M. et al. The plant heat stress transcription factors (HSFs): Structure, regulation, and function in response to abiotic stresses. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. FEB2016, p. 114, 9 fev. 2016.

GUO, S.; KEMPHUES, K. J. *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans*

embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. **Cell**, v. 81, n. 4, p. 611–620, 19 maio 1995.

GUPTA, A.; RICO-MEDINA, A.; CAÑO-DELGADO, A. I. The physiology of plant responses to drought. **Science**, v. 368, n. 6488, p. 266–269, 17 abr. 2020.

GURURANI, M. A. et al. Plant disease resistance genes: Current status and future directions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 78, p. 51–65, abr. 2012.

HACKENBERG, M. et al. Characterization of phosphorus-regulated miR399 and miR827 and their isomirs in barley under phosphorus-sufficient and phosphorus-deficient conditions. **BMC Plant Biology**, v. 13, n. 1, p. 1–17, 13 dez. 2013.

HALE, C. R. et al. RNA-Guided RNA Cleavage by a CRISPR RNA-Cas Protein Complex. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 945, 25 nov. 2009.

HAN, J.; KIM, D.; MORRIS, K. V. Promoter-associated RNA is required for RNA-directed transcriptional gene silencing in human cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 30, p. 12422–12427, 24 jul. 2007.

HAN, M. H. et al. The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 4, p. 1093–1098, 27 jan. 2004.

HAN, Y. et al. The suppression of WRKY44 by GIGANTEA-miR172 pathway is involved in drought response of Arabidopsis thaliana. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, 6 nov. 2013.

HASANUZZAMAN, M. et al. Regulation of Ascorbate-Glutathione Pathway in Mitigating Oxidative Damage in Plants under Abiotic Stress. **Antioxidants**, v. 8, n. 9, 1 set. 2019.

HAUSSECKER, D. et al. Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing. **RNA**, v. 16, n. 4, p. 673, abr. 2010.

HEISLER, M. G. B. et al. SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in Arabidopsis, encodes a bHLH protein. **Development (Cambridge, England)**, v. 128, n. 7, p. 1089–1098, 2001.

HIGGS, P. G.; LEHMAN, N. The RNA World: molecular cooperation at the origins of life. **Nature Reviews Genetics** 2014 16:1, v. 16, n. 1, p. 7–17, 11 nov. 2014.

HOAGLAND, M. B. et al. A SOLUBLE RIBONUCLEIC ACID INTERMEDIATE IN PROTEIN

SYNTHESIS*? **Journal of Biological Chemistry**, v. 231, p. 241–257, 1958.

HOHMANN, U.; LAU, K.; HOTHORN, M. The Structural Basis of Ligand Perception and Signal Activation by Receptor Kinases. **Annual review of plant biology**, v. 68, p. 109–137, 28 abr. 2017.

HOLBEIN, J.; GRUNDLER, F. M. W.; SIDDIQUE, S. Plant basal resistance to nematodes: an update. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 7, p. 2049–2061, 1 mar. 2016.

HOLLENDER, C.; LIU, Z. Histone Deacetylase Genes in Arabidopsis Development. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n. 7, p. 875–885, 1 jul. 2008.

HOWDEN, S. M. et al. Adapting agriculture to climate change. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 50, p. 19691–19696, 2007.

HUA, J. From freezing to scorching, transcriptional responses to temperature variations in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 5, p. 568–573, 1 out. 2009.

HUANG, G. et al. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 39, p. 14302–14306, 26 set. 2006.

HÜCKELHOVEN, R.; KOGEL, K. H. Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: Who is who in powdery mildew resistance? **Planta** **2003** **216:6**, v. 216, n. 6, p. 891–902, 11 fev. 2003.

HUNT, D. J.; HANDOO, Z. A. Taxonomy, identification and principal species. **Root-knot Nematodes**, p. 55–97, 13 out. 2009.

HUTVAGNER, G.; SIMARD, M. J. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** **2008** **9:1**, v. 9, n. 1, p. 22–32, jan. 2008.

IKI, T. et al. In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90. **Molecular cell**, v. 39, n. 2, p. 282–291, jul. 2010.

IKI, T. et al. Cyclophilin 40 facilitates HSP90-mediated RISC assembly in plants. **The EMBO journal**, v. 31, n. 2, p. 267–278, 18 jan. 2012.

IÑIGO, S. et al. Proteasome-mediated turnover of Arabidopsis MED25 is coupled to the activation of FLOWERING LOCUS T transcription. **Plant physiology**, v. 160, n. 3, p. 1662–1673, 97

2012.

ISLAM, M. et al. Activation of SnRK2 by Raf-like kinase ARK represents a primary mechanism of ABA and abiotic stress responses. **Plant Physiology**, v. 185, n. 2, p. 533–546, 15 mar. 2021.

IWAKAWA, H. OKI; TOMARI, Y. Molecular insights into microRNA-mediated translational repression in plants. **Molecular cell**, v. 52, n. 4, p. 591–601, 21 nov. 2013.

IWAMOTO, M.; TAGIRI, A. MicroRNA-targeted transcription factor gene RDD1 promotes nutrient ion uptake and accumulation in rice. **The Plant Journal**, v. 85, n. 4, p. 466–477, 1 fev. 2016.

JAGADEESWARAN, G.; SAINI, A.; SUNKAR, R. Biotic and abiotic stress down-regulate miR398 expression in Arabidopsis. **Planta**, v. 229, n. 4, p. 1009–1014, mar. 2009.

JALEEL, C. A. et al. Alterations in morphological parameters and photosynthetic pigment responses of *Catharanthus roseus* under soil water deficits. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 61, n. 2, p. 298–303, 15 fev. 2008.

JANUSZ, G. et al. Laccase Properties, Physiological Functions, and Evolution. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, 1 fev. 2020.

JARADAT, M. R. et al. Multiple roles of the transcription factor AtMYBR1/AtMYB44 in ABA signaling, stress responses, and leaf senescence. **BMC Plant Biology**, v. 13, n. 1, p. 1–19, 28 nov. 2013.

JAVELLE, M. et al. Epidermis: the formation and functions of a fundamental plant tissue. **New Phytologist**, v. 189, n. 1, p. 17–39, 1 jan. 2011.

JEYARAJ, A. et al. Identification of Regulatory Networks of MicroRNAs and Their Targets in Response to *Colletotrichum gloeosporioides* in Tea Plant (*Camellia sinensis* L.). **Frontiers in plant science**, v. 10, 12 set. 2019.

Jl, L. et al. ARGONAUTE10 and ARGONAUTE1 Regulate the Termination of Floral Stem Cells through Two MicroRNAs in Arabidopsis. **PLOS Genetics**, v. 7, n. 3, p. e1001358, mar. 2011.

JIANG, X. et al. RhNAC3, a stress-associated NAC transcription factor, has a role in dehydration tolerance through regulating osmotic stress-related genes in rose petals. **Plant biotechnology journal**, v. 12, n. 1, p. 38–48, jan. 2014.

JIANG, Z. et al. Plant cell-surface GIPC sphingolipids sense salt to trigger Ca²⁺ influx. **Nature**, v. 572, n. 7769, p. 341–346, 15 ago. 2019.

JOHNSON, N. R. et al. Improved placement of multi-mapping small RNAs. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 6, n. 7, p. 2103–2111, 1 jul. 2016.

JOHNSSON, P. et al. A pseudogene long-noncoding-RNA network regulates PTEN transcription and translation in human cells. **Nature structural & molecular biology**, v. 20, n. 4, p. 440–446, maio 2013.

JOHNSSON, P. et al. Evolutionary conservation of long non-coding RNAs; sequence, structure, function. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1840, n. 3, p. 1063–1071, 2014.

JOJOA-CRUZ, S. et al. Cryo-EM structure of the mechanically activated ion channel OSCA1.2. **eLife**, v. 7, 1 nov. 2018.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323–329, 16 nov. 2006.

JONES, J. T. et al. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular plant pathology**, v. 14, n. 9, p. 946–961, dez. 2013.

JONES-RHOADES, M. W.; BARTEL, D. P. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. **Molecular cell**, v. 14, n. 6, p. 787–799, 18 jun. 2004.

JONES-RHOADES, M. W.; BARTEL, D. P.; BARTEL, B. MicroRNAs AND THEIR REGULATORY ROLES IN PLANTS. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105218>, v. 57, p. 19–53, 2 maio 2006.

JUROSZEK, P. et al. Overview on the review articles published during the past 30 years relating to the potential climate change effects on plant pathogens and crop disease risks. **Plant Pathology**, v. 69, n. 2, p. 179–193, 1 fev. 2020.

KADOTA, Y. et al. Direct regulation of the NADPH oxidase RBOHD by the PRR-associated kinase BIK1 during plant immunity. **Molecular cell**, v. 54, n. 1, p. 43–55, 10 abr. 2014.

KALOSHIAN, I.; DESMOND, O. J.; ATAMIAN, H. S. Disease Resistance-Genes and Defense Responses During Incompatible Interactions. **Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions**, p. 309–324, 2011.

KANG, I. H. et al. The AGL62 MADS Domain Protein Regulates Cellularization during Endosperm Development in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 20, n. 3, p. 635, 2008.

KARAJEH, M. R. Interaction of Root-Knot Nematode (*Meloidogyne Javanica*) and Tomato As Affected By Hydrogen Peroxide. **Journal of Plant Protection Research**, v. 48, n. 2, p. 181–187, 2008.

KARCZMAREK, A. et al. Feeding cell development by cyst and root-knot nematodes involves a similar early, local and transient activation of a specific auxin-inducible promoter element. **Molecular plant pathology**, v. 5, n. 4, p. 343–346, jul. 2004.

KEMPEL, A. et al. Tradeoffs associated with constitutive and induced plant resistance against herbivory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 14, p. 5685–5689, 5 abr. 2011.

KIM, J. S. et al. An ABRE Promoter Sequence is Involved in Osmotic Stress-Responsive Expression of the DREB2A Gene, Which Encodes a Transcription Factor Regulating Drought-Inducible Genes in Arabidopsis. **Plant and Cell Physiology**, v. 52, n. 12, p. 2136–2146, 1 dez. 2011a.

KIM, M. H. et al. Poplar MYB transcription factor PtrMYB012 and its Arabidopsis AtGAMYB orthologs are differentially repressed by the Arabidopsis miR159 family. **Tree Physiology**, v. 38, n. 6, p. 801–812, 1 jun. 2018.

KIM, S. et al. Synaptotagmin 4 and 5 additively contribute to Arabidopsis immunity to *Pseudomonas syringae* DC3000. **Plant signaling & behavior**, v. 17, n. 1, 2022.

KIM, T. H. et al. Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. **Annual review of plant biology**, v. 61, p. 561–591, 2 jun. 2010.

KIM, Y. et al. Roles of CAMTA transcription factors and salicylic acid in configuring the low-temperature transcriptome and freezing tolerance of Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 75, n. 3, p. 364–376, 1 ago. 2013.

KIM, Y. J. et al. The role of Mediator in small and long noncoding RNA production in Arabidopsis thaliana. **The EMBO Journal**, v. 30, n. 5, p. 814, 2 mar. 2011b.

KINOSHITA, N. et al. IAA-Ala Resistant3, an Evolutionarily Conserved Target of miR167,
100

Mediates Arabidopsis Root Architecture Changes during High Osmotic Stress. **The Plant Cell**, v. 24, n. 9, p. 3590–3602, 24 out. 2012.

KOCHERT, G. et al. RFLP variability in peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars and wild species. **Theoretical and Applied Genetics** 1991 **81:5**, v. 81, n. 5, p. 565–570, maio 1991.

KOECK, M.; HARDHAM, A. R.; DODDS, P. N. The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection. **Cellular microbiology**, v. 13, n. 12, p. 1849, dez. 2011.

KOYAMA, T.; SATO, F.; OHME-TAKAGI, M. Roles of miR319 and TCP Transcription Factors in Leaf Development. **Plant Physiology**, v. 175, n. 2, p. 874–885, 27 set. 2017.

KOZOMARA, A.; BIRGAOANU, M.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: from microRNA sequences to function. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D155–D162, 8 jan. 2019.

KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W. C. Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, v. 16, n. 0, p. 1–205, 1 jan. 2007.

KREPS, J. A. et al. Transcriptome Changes for Arabidopsis in Response to Salt, Osmotic, and Cold Stress. **Plant Physiology**, v. 130, n. 4, p. 2129, 1 dez. 2002.

KU, Y. S. et al. Small RNAs in Plant Responses to Abiotic Stresses: Regulatory Roles and Study Methods. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 10, p. 24532–24554, 15 out. 2015.

KUMAR, V.; SPANGENBERG, O.; KONRAD, M. Cloning of the guanylate kinase homologues AGK-1 and AGK-2 from Arabidopsis thaliana and characterization of AGK-1. **European journal of biochemistry**, v. 267, n. 2, p. 606–615, 2000.

KUROMORI, T. et al. ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 5, p. 2361–2366, 2 fev. 2010.

LAI, Z.; MENGISTE, T. Genetic and cellular mechanisms regulating plant responses to necrotrophic pathogens. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, n. 4, p. 505–512, 1 ago. 2013.

LAL, N. K. et al. The Receptor-like Cytoplasmic Kinase BIK1 Localizes to the Nucleus and Regulates Defense Hormone Expression during Plant Innate Immunity. **Cell host & microbe**, v. 23, n. 4, p. 485–497.e5, 11 abr. 2018.

LÄMKE, J.; BÄURLE, I. Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental

stress adaptation and stress memory in plants. **Genome Biology** **2017 18:1**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 27 jun. 2017.

LANGMEAD, B. et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. **Genome Biology**, v. 10, n. 3, p. 1–10, 4 mar. 2009.

LAPIN, D.; VAN DEN ACKERVEKEN, G. Susceptibility to plant disease: more than a failure of host immunity. **Trends in plant science**, v. 18, n. 10, p. 546–554, out. 2013.

LEE, B. R. et al. Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 6, p. 1271–1279, 1 abr. 2007.

LEE, H. G.; SEO, P. J. MYB96 recruits the HDA15 protein to suppress negative regulators of ABA signaling in Arabidopsis. **Nature Communications** **2019 10:1**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 12 abr. 2019.

LEE, M. H. et al. An Arabidopsis NAC transcription factor NAC4 promotes pathogen-induced cell death under negative regulation by microRNA164. **New Phytologist**, v. 214, n. 1, p. 343–360, 1 abr. 2017.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROST, V. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, p. 843–854, 1993.

LEI, J. et al. Plastidic pyruvate dehydrogenase complex E1 component subunit Alpha1 is involved in galactolipid biosynthesis required for amyloplast development in rice. **Plant Biotechnology Journal**, v. 20, n. 3, p. 437–453, 1 mar. 2022.

LEONETTI, P. et al. Viruses and Phytoparasitic Nematodes of *Cicer arietinum* L.: Biotechnological Approaches in Interaction Studies and for Sustainable Control. **Frontiers in plant science**, v. 9, 15 mar. 2018.

LI, F. et al. MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 5, p. 1790–1795, 31 jan. 2012.

LI, J. et al. Methylation Protects miRNAs and siRNAs from a 3'-End Uridylation Activity in Arabidopsis. **Current biology : CB**, v. 15, n. 16, p. 1501, 23 ago. 2005.

LI, Q. et al. Transmembrane Kinases are essential for plant development. **bioRxiv**, p. 102

2021.03.11.434919, 12 mar. 2021.

LI, S. et al. HEAT-INDUCED TAS1 TARGET1 Mediates Thermotolerance via HEAT STRESS TRANSCRIPTION FACTOR A1a-Directed Pathways in Arabidopsis. **The Plant cell**, v. 26, n. 4, p. 1764–1780, 2014.

LI, S.; ZACHGO, S. TCP3 interacts with R2R3-MYB proteins, promotes flavonoid biosynthesis and negatively regulates the auxin response in Arabidopsis thaliana. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 76, n. 6, p. 901–913, dez. 2013.

LI, W. et al. Overexpression of soybean miR172c confers tolerance to water deficit and salt stress, but increases ABA sensitivity in transgenic Arabidopsis thaliana. **Journal of experimental botany**, v. 67, n. 1, p. 175–194, 1 jan. 2016.

LI, W. X. et al. The Arabidopsis NFYA5 Transcription Factor Is Regulated Transcriptionally and Posttranscriptionally to Promote Drought Resistance. **The Plant Cell**, v. 20, n. 8, p. 2238, 2008.

LI, Y. et al. Identification of microRNAs involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered plant innate immunity. **Plant physiology**, v. 152, n. 4, p. 2222–2231, 2010.

LIANG, C. et al. OsNAP connects abscisic acid and leaf senescence by fine-tuning abscisic acid biosynthesis and directly targeting senescence-associated genes in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 27, p. 10013–10018, 8 jul. 2014.

LIANG, G.; YU, D. Reciprocal regulation among miR395, APS and SULTR2;1 in Arabidopsis thaliana. <https://doi.org/10.4161/psb.5.10.12608>, v. 5, n. 10, p. 1257–1259, 2010.

LIANG, X.; ZHOU, J. M. Receptor-Like Cytoplasmic Kinases: Central Players in Plant Receptor Kinase-Mediated Signaling. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040540>, v. 69, p. 267–299, 2 maio 2018.

LIEBSCH, D.; PALATNIK, J. F. MicroRNA miR396, GRF transcription factors and GIF co-regulators: a conserved plant growth regulatory module with potential for breeding and biotechnology. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 53, p. 31–42, 1 fev. 2020.

LIU, B. et al. Lysin motif-containing proteins LYP4 and LYP6 play dual roles in peptidoglycan and chitin perception in rice innate immunity. **Plant Cell**, v. 24, n. 8, p. 3406–3419, 103

2012.

LIU, B.; SUN, G. microRNAs contribute to enhanced salt adaptation of the autopolyploid *Hordeum bulbosum* compared with its diploid ancestor. **The Plant Journal**, v. 91, n. 1, p. 57–69, 1 jul. 2017.

LIU, H. H. et al. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. **RNA**, v. 14, n. 5, p. 836, maio 2008.

LIU, J. et al. A receptor-like cytoplasmic kinase phosphorylates the host target RIN4, leading to the activation of a plant innate immune receptor. **Cell host & microbe**, v. 9, n. 2, p. 137–146, 17 fev. 2011.

LOPEZ-MOLINA, L.; MONGRAND, S.; CHUA, N. H. A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 8, p. 4782–4787, 10 abr. 2001.

LOVE, M.; ANDERS, S.; HUBER, W. Beginner's guide to using the DESeq2 package. 2014.

LU, S.; SUN, Y. H.; CHIANG, V. L. Stress-responsive microRNAs in *Populus*. **The Plant Journal**, v. 55, n. 1, p. 131–151, 1 jul. 2008.

LUAN, Y. et al. High-throughput sequencing reveals differential expression of miRNAs in tomato inoculated with *Phytophthora infestans*. **Planta**, v. 241, n. 6, p. 1405–1416, 1 jun. 2015.

LUAN, Y. et al. Effective enhancement of resistance to *Phytophthora infestans* by overexpression of miR172a and b in *Solanum lycopersicum*. **Planta**, v. 247, n. 1, p. 127–138, 1 jan. 2018.

LUO, Q. J. et al. An autoregulatory feedback loop involving PAP1 and TAS4 in response to sugars in *Arabidopsis*. **Plant molecular biology**, v. 80, n. 1, p. 117–129, set. 2012.

MA, H. et al. The Phytoeyanin Gene Family in Rice (*Oryza sativa* L.): Genome-Wide Identification, Classification and Transcriptional Analysis. **PLOS ONE**, v. 6, n. 10, p. e25184, 3 out. 2011.

MA, J. et al. The Control of Developmental Phase Transitions by microRNAs and Their Targets in Seed Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 6, 1 mar. 2020a.

MA, S. et al. Direct pathogen-induced assembly of an NLR immune receptor complex to

form a holoenzyme. **Science**, v. 370, n. 6521, 4 dez. 2020b.

MA, S.; BOHNERT, H. J. Integration of Arabidopsis thaliana stress-related transcript profiles, promoter structures, and cell-specific expression. **Genome biology**, v. 8, n. 4, 4 abr. 2007.

MA, Y. et al. Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. **Science (New York, N.Y.)**, v. 324, n. 5930, p. 1064–1068, 22 maio 2009.

MAGOME, H. et al. dwarf and delayed-flowering 1, a novel Arabidopsis mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 37, n. 5, p. 720–729, mar. 2004.

MAITY, K. et al. Cryo-EM structure of OSCA1.2 from Oryza sativa elucidates the mechanical basis of potential membrane hyperosmolality gating. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 28, p. 14309–14318, 2019.

MANAVELLA, P. A. et al. Fast-forward genetics identifies plant CPL phosphatases as regulators of miRNA processing factor HYL1. **Cell**, v. 151, n. 4, p. 859–870, 9 nov. 2012.

MANOSALVA, P. et al. Conserved nematode signalling molecules elicit plant defenses and pathogen resistance. **Nature Communications 2015 6:1**, v. 6, n. 1, p. 1–8, 23 jul. 2015.

MARGIS, R. et al. The evolution and diversification of Dicers in plants. **FEBS letters**, v. 580, n. 10, p. 2442–2450, 1 maio 2006.

MARIN, E. et al. miR390, Arabidopsis TAS3 tasiRNAs, and their AUXIN RESPONSE FACTOR targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth. **The Plant cell**, v. 22, n. 4, p. 1104–1117, 2010.

MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet.journal**, v. 17, n. 1, p. 10, 2 maio 2011.

MARUYAMA, K. et al. Identification of cis-acting promoter elements in cold- and dehydration-induced transcriptional pathways in Arabidopsis, rice, and soybean. **DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes**, v. 19, n. 1, p. 37–49, fev. 2012.

MATAMOROS, M. A.; BECANA, M. Molecular responses of legumes to abiotic stress: post-translational modifications of proteins and redox signaling. **Journal of Experimental Botany**, v. 105

72, n. 16, p. 5876–5892, 11 ago. 2021.

MATTICK, J. S. The Genetic Signatures of Noncoding RNAs. **PLOS Genetics**, v. 5, n. 4, p. e1000459, abr. 2009.

MATZKE, M. A. et al. Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. **The EMBO Journal**, v. 8, n. 3, p. 643, mar. 1989.

MATZKE, M. A.; MOSHER, R. A. RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. 2014.

MAXWELL, E. S.; FOURNIER, M. J. THE SMALL NUCLEOLAR RNAs. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.004341>, v. 64, p. 897–934, 28 nov. 2003.

MCAINSH, M. R.; PITTMAN, J. K. Shaping the calcium signature. **New Phytologist**, v. 181, n. 2, p. 275–294, 1 jan. 2009.

MCCONNELL, J. R. et al. Role of PHABULOSA and PHAVOLUTA in determining radial patterning in shoots. **Nature** 2001 411:6838, v. 411, n. 6838, p. 709–713, 1 jun. 2001.

MEE, Y. P. et al. Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 10, p. 3691–3696, 8 mar. 2005.

MENDY, B. et al. Arabidopsis leucine-rich repeat receptor–like kinase NILR1 is required for induction of innate immunity to parasitic nematodes. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 4, p. e1006284, 1 abr. 2017.

MERCER, T. R. et al. Specific expression of long noncoding RNAs in the mouse brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 2, p. 716–721, 15 jan. 2008.

MERCER, T. R. et al. Targeted RNA sequencing reveals the deep complexity of the human transcriptome. **Nature Biotechnology** 2011 30:1, v. 30, n. 1, p. 99–104, 13 nov. 2011.

MERRET, R. et al. Heat-induced ribosome pausing triggers mRNA co-translational decay in Arabidopsis thaliana. **Nucleic acids research**, v. 43, n. 8, p. 4121–4132, 6 mar. 2015.

MEYER, S. L. F. et al. Mustard seed meal for management of root-knot nematode and weeds in tomato production. **HortTechnology**, v. 25, n. 2, p. 192–202, 2015.

MEYERS, B. C. et al. Criteria for Annotation of Plant MicroRNAs. **The Plant Cell**, v. 20, n. 106

12, p. 3186, 2008.

MI, S. et al. Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. **Cell**, v. 133, n. 1, p. 116–127, 4 abr. 2008.

MILLIGAN, S. B. et al. The root knot nematode resistance gene Mi from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. **The Plant cell**, v. 10, n. 8, p. 1307–1319, 1998.

MONTGOMERY, T. A. et al. Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. **Cell**, v. 133, n. 1, p. 128–141, 4 abr. 2008.

MORAN, Y. et al. The evolutionary origin of plant and animal microRNAs. **Nature ecology & evolution**, v. 1, n. 3, 21 fev. 2017.

MORANT, A. V. et al. β -Glucosidases as detonators of plant chemical defense. **Phytochemistry**, v. 69, n. 9, p. 1795–1813, 1 jun. 2008.

MOTA, A. P. Z. et al. Defining the combined stress response in wild *Arachis*. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.

MUKHERJEE, K.; CAMPOS, H.; KOLACZKOWSKI, B. Evolution of animal and plant dicers: early parallel duplications and recurrent adaptation of antiviral RNA binding in plants. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 3, p. 627–641, mar. 2013.

MUNNIK, T.; TESTERINK, C. Plant phospholipid signaling: “in a nutshell.” **Journal of lipid research**, v. 50 Suppl, n. Suppl, abr. 2009.

NAHAR, K. et al. The jasmonate pathway is a key player in systemically induced defense against root knot nematodes in rice. **Plant physiology**, v. 157, n. 1, p. 305–316, 2011.

NAKASHIMA, K.; ITO, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Transcriptional Regulatory Networks in Response to Abiotic Stresses in Arabidopsis and Grasses. **Plant Physiology**, v. 149, n. 1, p. 88, 2009.

NAMBARA, E.; MARION-POLL, A. ABSCISIC ACID BIOSYNTHESIS AND CATABOLISM. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144046>, v. 56, p. 165–185, 29 abr. 2005.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. **The Plant cell**, v. 2, n. 4, p. 279–289, 1 abr. 1990.

NASEEM, M. et al. Auxin Crosstalk to Plant Immune Networks: A Plant-Pathogen Interaction Perspective. **Current Protein & Peptide Science**, v. 16, n. 5, p. 389–394, 28 maio 2015.

NATIONS, U. et al. World Population Prospects 2019 Highlights. 2019.

NAVARRETE, M. et al. A resistant pepper used as a trap cover crop in vegetable production strongly decreases root-knot nematode infestation in soil. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 36, n. 4, 1 dez. 2016.

NAVARRO, L. et al. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. **Science**, v. 312, n. 5772, p. 436–439, 21 abr. 2006.

NG, L. M. et al. Abscisic acid perception and signaling: structural mechanisms and applications. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 35, n. 5, p. 567–584, 1 maio 2014.

NGOU, B. P. M. et al. Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. **Nature**, v. 592, n. 7852, p. 110–115, 1 abr. 2021.

NGUYEN, C. N. et al. A root-knot nematode small glycine and cysteine-rich secreted effector, MiSGCR1, is involved in plant parasitism. **New Phytologist**, v. 217, n. 2, p. 687–699, 1 jan. 2018.

NIU, J. et al. Msp40 effector of root-knot nematode manipulates plant immunity to facilitate parasitism. **Scientific Reports 2016 6:1**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 22 jan. 2016.

NOZAWA, M.; MIURA, S.; NEI, M. Origins and Evolution of MicroRNA Genes in Plant Species. **Genome Biology and Evolution**, v. 4, n. 3, p. 230, 1 jan. 2012.

OKUMA, N. et al. MIR2111-5 locus and shoot-accumulated mature miR2111 systemically enhance nodulation depending on HAR1 in *Lotus japonicus*. **Nature Communications 2020 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 15 out. 2020.

OTSUGA, D. et al. REVOLUTA regulates meristem initiation at lateral positions. **The Plant Journal**, v. 25, n. 2, p. 223–236, 1 jan. 2001.

PALADE, G. E. A SMALL PARTICULATE COMPONENT OF THE CYTOPLASM. **The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v. 1, n. 1, p. 59–68, 25 jan. 1955.

PALAZZO, A. F.; LEE, E. S. Non-coding RNA: What is functional and what is junk? **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. JAN, p. 2, 2015.

PANDEY, M. K. et al. Advances in *Arachis* genomics for peanut improvement.

Biotechnology advances, v. 30, n. 3, p. 639–651, maio 2012.

PANI, A.; MAHAPATRA, R. K. Computational identification of microRNAs and their targets in *Catharanthus roseus* expressed sequence tags. **Genomics Data**, v. 1, p. 2–6, 1 dez. 2013.

PARK, B. S. et al. Ubiquitination of LHY by SINAT5 regulates flowering time and is inhibited by DET1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 398, n. 2, p. 242–246, 23 jul. 2010.

PARK, S. Y. et al. Abscisic acid inhibits PP2Cs via the PYR/PYL family of ABA-binding START proteins. **Science (New York, N.Y.)**, v. 324, n. 5930, p. 1068, 5 maio 2009.

PARK, W. et al. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. **Current biology : CB**, v. 12, n. 17, p. 1484–1495, 3 set. 2002.

PENG, K. et al. Tae-miR399- UBC24 Module Enhances Freezing Tolerance in Winter Wheat via a CBF Signaling Pathway. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 45, p. 13398–13415, 17 nov. 2021.

PINHEIRO, C.; CHAVES, M. M. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 3, p. 869–882, 1 jan. 2011.

PRITCHARD, L.; BIRCH, P. R. J. The zigzag model of plant-microbe interactions: Is it time to move on? **Molecular Plant Pathology**, v. 15, n. 9, p. 865–870, 1 dez. 2014.

QI, J. et al. Reactive oxygen species signaling and stomatal movement in plant responses to drought stress and pathogen attack. **Journal of integrative plant biology**, v. 60, n. 9, p. 805–826, 1 set. 2018.

QIN, Z. et al. Novel insights from non-conserved microRNAs in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. October, p. 586, 28 out. 2014.

RAJAGOPALAN, R. et al. A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. **Genes & development**, v. 20, n. 24, p. 3407–3425, 15 dez. 2006.

REINHART, B. J. et al. MicroRNAs in plants. **Genes & development**, v. 16, n. 13, p. 1616–1626, 1 jul. 2002.

REN, G. et al. Regulation of miRNA abundance by RNA binding protein TOUGH in

Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 31, p. 12817–12821, 31 jul. 2012.

REYES, J. L.; CHUA, N. H. ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 49, n. 4, p. 592–606, fev. 2007.

RHOADES, M. W. et al. Prediction of plant microRNA targets. **Cell**, v. 110, n. 4, p. 513–520, 23 ago. 2002.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139–140, 1 jan. 2010.

ROUX, M. et al. The Arabidopsis Leucine-Rich Repeat Receptor–Like Kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 Are Required for Innate Immunity to Hemibiotrophic and Biotrophic Pathogens. **The Plant Cell**, v. 23, n. 6, p. 2440–2455, 1 jun. 2011.

RUI, C. et al. Genome-wide expression analysis of carboxylesterase (CXE) gene family implies GBCXE49 functional responding to alkaline stress in cotton. **BMC Plant Biology**, v. 22, n. 1, p. 1–16, 1 dez. 2022.

RUIZ-LOPEZ, N. et al. Synaptotagmins at the endoplasmic reticulum–plasma membrane contact sites maintain diacylglycerol homeostasis during abiotic stress. **The Plant Cell**, v. 33, n. 7, p. 2431–2453, 13 ago. 2021.

RYAN, C. A. et al. Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 10, p. 4114, 5 maio 1995.

SAILE, S. C. et al. Two unequally redundant “helper” immune receptor families mediate Arabidopsis thaliana intracellular “sensor” immune receptor functions. **PLOS Biology**, v. 18, n. 9, p. e3000783, 1 set. 2020.

SAKUMA, Y. et al. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 290, n. 3, p. 998–1009, 2002.

SAPPL, P. G. et al. The Arabidopsis glutathione transferase gene family displays complex

stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 58, n. 1, p. 53–68, 2009.

SARUHASHI, M. et al. Plant Raf-like kinase integrates abscisic acid and hyperosmotic stress signaling upstream of SNF1-related protein kinase2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 46, p. E6388–E6396, 17 nov. 2015.

SATO, H. et al. NF-YB2 and NF-YB3 Have Functionally Diverged and Differentially Induce Drought and Heat Stress-Specific Genes. **Plant Physiology**, v. 180, n. 3, p. 1677–1690, 28 jun. 2019.

SAUCET, S. B. et al. Resistance to root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. in woody plants. **New Phytologist**, v. 211, n. 1, p. 41–56, 1 jul. 2016.

SCHMIDT, S. M. et al. Comparative genomics of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* reveals the secreted protein recognized by the Fom-2 resistance gene in melon. **The New phytologist**, v. 209, n. 1, p. 307–318, 1 jan. 2016.

SCHOMBURG, F. M. et al. FPA, a Gene Involved in Floral Induction in *Arabidopsis*, Encodes a Protein Containing RNA-Recognition Motifs. **The Plant Cell**, v. 13, n. 6, p. 1427, 2001.

SCHWAB, R. et al. Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. **Developmental cell**, v. 8, n. 4, p. 517–527, abr. 2005.

SEIJO, J. G. et al. Physical mapping of the 5S and 18S–25S rRNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaensis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (Leguminosae). **American Journal of Botany**, v. 91, n. 9, p. 1294–1303, 1 set. 2004.

SEO, P. J. et al. The MYB96 transcription factor mediates abscisic acid signaling during drought stress response in *Arabidopsis*. **Plant physiology**, v. 151, n. 1, p. 275–289, 2009.

SHAVRUKOV, Y. et al. Early flowering as a drought escape mechanism in plants: How can it aid wheat production? **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1950, 17 nov. 2017.

SHEN, J. et al. The NAC-type transcription factor OsNAC2 regulates ABA-dependent genes and abiotic stress tolerance in rice. **Scientific Reports**, v. 7, 11 jan. 2017.

SHIKANAI, T. Chloroplast NDH: A different enzyme with a structure similar to that of respiratory NADH dehydrogenase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1857, n. 7, p. 1015–1022, 1 jul. 2016.

SHIVAPRASAD, P. V. et al. A microRNA superfamily regulates nucleotide binding site-leucine-rich repeats and other mRNAs. **The Plant cell**, v. 24, n. 3, p. 859–874, 2012.

SINGROHA, G.; SHARMA, P.; SUNKUR, R. Current status of microRNA-mediated regulation of drought stress responses in cereals. **Physiologia Plantarum**, v. 172, n. 3, p. 1808–1821, 1 jul. 2021.

SKIRYCZ, A.; INZÉ, D. More from less: Plant growth under limited water. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 197–203, abr. 2010.

SMIT, P. et al. NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial nod factor-induced transcription. **Science**, v. 308, n. 5729, p. 1789–1791, 17 jun. 2005.

SMITH, H. M. et al. SNP markers tightly linked to root knot nematode resistance in grapevine (*Vitis cinerea*) identified by a genotyping-by-sequencing approach followed by Sequenom MassARRAY validation. **PloS one**, v. 13, n. 2, 1 fev. 2018.

SOARES-SILVA, M. et al. The mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway: Role in immune evasion by trypanosomatids. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. FEB, 24 fev. 2016.

SONG, T. et al. Two RxLR avirulence genes in *Phytophthora sojae* determine soybean Rps1k-mediated disease resistance. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 26, n. 7, p. 711–720, jul. 2013.

SOON, F. F. et al. Molecular mimicry regulates ABA signaling by SnRK2 kinases and PP2C phosphatases. **Science (New York, N.Y.)**, v. 335, n. 6064, p. 85–88, 6 jan. 2012.

SOURET, F. F.; KASTENMAYER, J. P.; GREEN, P. J. AtXRN4 degrades mRNA in Arabidopsis and its substrates include selected miRNA targets. **Molecular cell**, v. 15, n. 2, p. 173–183, 23 jul. 2004.

SPOEL, S. H.; DONG, X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. **Nature Reviews Immunology 2012 12:2**, v. 12, n. 2, p. 89–100, 25 jan. 2012.

SU, L. et al. Suppression on plant-parasitic nematodes using a soil fumigation strategy based on ammonium bicarbonate and its effects on the nematode community. **Scientific Reports**, v. 5, 1 dez. 2015.

SULLIVAN, M. L. Beyond brown: Polyphenol oxidases as enzymes of plant specialized metabolism. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. JAN, p. 1–7, 14 jan. 2015.

SUN, X. et al. A characterization of grapevine of GRAS domain transcription factor gene family. **Functional & Integrative Genomics** 2016 16:4, v. 16, n. 4, p. 347–363, 3 fev. 2016.

SUN, X. et al. Pathogen effector recognition-dependent association of NRG1 with EDS1 and SAG101 in TNL receptor immunity. **Nature communications**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2021.

SUN, Y. et al. Structural basis for flg22-induced activation of the Arabidopsis FLS2-BAK1 immune complex. **Science**, v. 342, n. 6158, p. 624–628, 1 nov. 2013.

SUNG, T. Y. et al. The ACR11 encodes a novel type of chloroplastic ACT domain repeat protein that is coordinately expressed with GLN2 in Arabidopsis. **BMC plant biology**, v. 11, 24 ago. 2011.

SUNKAR, R. et al. Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 7, p. 301–309, 1 jul. 2007.

SUNKAR, R.; KAPOOR, A.; ZHU, J. K. Posttranscriptional Induction of Two Cu/Zn Superoxide Dismutase Genes in Arabidopsis Is Mediated by Downregulation of miR398 and Important for Oxidative Stress Tolerance. **The Plant Cell**, v. 18, n. 8, p. 2051, 2006.

SUNKAR, R.; ZHU, J. K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. **The Plant cell**, v. 16, n. 8, p. 2001–2019, 2004.

TAFT, R. J. et al. Small RNAs derived from snoRNAs. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 15, n. 7, p. 1233–1240, jul. 2009.

TAFT, R. J. et al. Nuclear-localized tiny RNAs are associated with transcription initiation and splice sites in metazoans. **Nature Structural & Molecular Biology** 2010 17:8, v. 17, n. 8, p. 1030–1034, 11 jul. 2010.

TAFT, R. J. et al. The relationship between transcription initiation RNAs and CCCTC-binding factor (CTCF) localization. **Epigenetics & chromatin**, v. 4, n. 1, 2011.

TAFT, R. J.; PHEASANT, M.; MATTICK, J. S. The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 29, n. 3, p. 288–299, mar. 2007.

TANAKA, H. et al. Novel receptor-like kinase ALE2 controls shoot development by specifying epidermis in Arabidopsis. **Development**, v. 134, n. 9, p. 1643–1652, 1 maio 2007.

TANG, R. J. et al. Tonoplast CBL-CIPK calcium signaling network regulates magnesium

homeostasis in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 10, p. 3134–3139, 10 mar. 2015.

TAYLOR, R. S. et al. Evolutionary history of plant microRNAs. **Trends in plant science**, v. 19, n. 3, p. 175–182, mar. 2014.

TEH, O. K. et al. BEACH-domain proteins act together in a cascade to mediate vacuolar protein trafficking and disease resistance in Arabidopsis. **Molecular plant**, v. 8, n. 3, p. 389–398, 2 mar. 2015.

TEILLET, A. et al. Transcriptional Changes of the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita* in Response to Arabidopsis thaliana Root Signals. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 61259, 12 abr. 2013.

TEIXEIRA, M. A.; WEI, L.; KALOSHIAN, I. Root-knot nematodes induce pattern-triggered immunity in Arabidopsis thaliana roots. **The New phytologist**, v. 211, n. 1, p. 276–287, 1 jul. 2016.

TEOTIA, P. S.; MUKHERJEE, S. K.; MISHRA, N. S. Fine tuning of auxin signaling by miRNAs. **Physiology and molecular biology of plants : an international journal of functional plant biology**, v. 14, n. 1–2, p. 81–90, abr. 2008.

THOR, K. et al. The calcium-permeable channel OSCA1.3 regulates plant stomatal immunity. **Nature** **2020 585:7826**, v. 585, n. 7826, p. 569–573, 26 ago. 2020.

TOLIA, N. H.; JOSHUA-TOR, L. Slicer and the Argonautes. **Nature Chemical Biology** **2007 3:1**, v. 3, n. 1, p. 36–43, 15 dez. 2006.

TOOMER, O. T. Nutritional chemistry of the peanut (*Arachis hypogaea*). **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 58, n. 17, p. 3042–3053, 22 nov. 2018.

TRANIER, M. S. et al. Commercial Biological Control Agents Targeted Against Plant-Parasitic Root-knot Nematodes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 6, p. 831–841, 2014.

TRIPATHI, L. et al. Field resistance of transgenic plantain to nematodes has potential for future African food security. **Scientific Reports**, v. 5, 30 jan. 2015.

UM, T. et al. Rice microRNA171f/SCL6 module enhances drought tolerance by regulation of flavonoid biosynthesis genes. **Plant Direct**, v. 6, n. 1, p. e374, 1 jan. 2022.

UMEZAWA, T. et al. CYP707A3, a major ABA 8'-hydroxylase involved in dehydration and

rehydration response in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 46, n. 2, p. 171–182, abr. 2006.

UMEZAWA, T. et al. Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: Sensing, signaling and transport. **Plant and Cell Physiology**, v. 51, n. 11, p. 1821–1839, nov. 2010.

VAN DER HOORN, R. A. L.; KAMOUN, S. From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. **The Plant Cell**, v. 20, n. 8, p. 2009–2017, 30 set. 2008.

VAN DER KROL, A. R. et al. Inhibition of flower pigmentation by antisense CHS genes: promoter and minimal sequence requirements for the antisense effect. **Plant molecular biology**, v. 14, n. 4, p. 457–466, abr. 1990.

VAUCHERET, H.; MALLORY, A. C.; BARTEL, D. P. AGO1 Homeostasis Entails Coexpression of MIR168 and AGO1 and Preferential Stabilization of miR168 by AGO1. **Molecular cell**, v. 22, n. 1, p. 129, 4 abr. 2006.

VAZQUEZ, F. et al. Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* mRNAs. **Molecular cell**, v. 16, n. 1, p. 69–79, 8 out. 2004.

WAN, J. et al. A LysM Receptor-Like Kinase Plays a Critical Role in Chitin Signaling and Fungal Resistance in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 20, n. 2, p. 471, 2008.

WANG, C. et al. Identification and characterization of a novel carboxylesterase (FpbH) that hydrolyzes aryloxyphenoxypropionate herbicides. **Biotechnology Letters** 2017 39:4, v. 39, n. 4, p. 553–560, 5 jan. 2017.

WANG, F.; PERRY, S. E. Identification of Direct Targets of FUSCA3, a Key Regulator of *Arabidopsis* Seed Development. **Plant Physiology**, v. 161, n. 3, p. 1251–1264, 28 fev. 2013.

WANG, J. et al. Reconstitution and structure of a plant NLR resistosome conferring immunity. **Science**, v. 364, n. 6435, 5 abr. 2019.

WANG, J. W.; CZECH, B.; WEIGEL, D. miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. **Cell**, v. 138, n. 4, p. 738–749, 21 ago. 2009.

WANG, Y. et al. Soybean miR172c Targets the Repressive AP2 Transcription Factor NNC1 to Activate ENOD40 Expression and Regulate Nodule Initiation. **The Plant Cell**, v. 26, n. 12, p. 4782, 2014.

WANG, Y. et al. Leucine-rich repeat receptor-like gene screen reveals that Nicotiana RXEG1 regulates glycoside hydrolase 12 MAMP detection. **Nature communications**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2018.

WASSENEGGER, M. et al. RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. **Cell**, v. 76, n. 3, p. 567–576, 11 fev. 1994.

WATERHOUSE, P. M.; GRAHAM, M. W.; WANG, M.-B. **Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA** *Plant Biology Communicated by W. James Peacock, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.pnas.org>.

WEI, L. et al. Differentially Expressed miRNAs Potentially Involved in the Regulation of Defense Mechanism to Drought Stress in Maize Seedlings. <https://doi.org/10.1086/605122>, v. 170, n. 8, p. 979–989, 17 jul. 2015.

WEINBERG, R. A.; PENMAN, S. Small molecular weight monodisperse nuclear RNA. **Journal of Molecular Biology**, v. 38, n. 3, p. 289–304, 28 dez. 1968.

WEN, C. K.; CHANG, C. Arabidopsis RGL1 Encodes a Negative Regulator of Gibberellin Responses. **The Plant Cell**, v. 14, n. 1, p. 87, 2002.

WILLMANN, M. R. et al. The Functions of RNA-Dependent RNA Polymerases in Arabidopsis. **The arabidopsis book**, v. 9, p. e0146, jan. 2011.

WINKLER, W. C. Riboswitches and the role of noncoding RNAs in bacterial metabolic control. **Current opinion in chemical biology**, v. 9, n. 6, p. 594–602, dez. 2005.

WONG, J. et al. Roles of small RNAs in soybean defense against *Phytophthora sojae* infection. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 79, n. 6, p. 928–940, 2014.

WU, H. C.; BULGAKOV, V. P.; JINN, T. L. Pectin methylesterases: Cell wall remodeling proteins are required for plant response to heat stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 871, p. 1612, 2018.

WU, L. et al. DNA methylation mediated by a microRNA pathway. **Molecular cell**, v. 38, n. 3, p. 465–475, 14 maio 2010.

WU, S.; SHAN, L.; HE, P. Microbial Signature-Triggered Plant Defense Responses and Early Signaling Mechanisms. **Plant science : an international journal of experimental plant biology**, v. 116

0, p. 118, 1 nov. 2014.

XIA, R.; XU, J.; MEYERS, B. C. The Emergence, Evolution, and Diversification of the miR390-TAS3-ARF Pathway in Land Plants. **The Plant Cell**, v. 29, n. 6, p. 1232, 1 jun. 2017.

XIANG, T. et al. Pseudomonas syringae effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. **Current biology : CB**, v. 18, n. 1, p. 74–80, 8 jan. 2008.

XIE, Q. et al. Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. **Genes & development**, v. 14, n. 23, p. 3024–3036, 2000.

XIE, Q. et al. SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals. **Nature** **2002 419:6903**, v. 419, n. 6903, p. 167–170, 12 set. 2002.

XIE, Z. et al. Genetic and Functional Diversification of Small RNA Pathways in Plants. **PLOS Biology**, v. 2, n. 5, p. e104, 2004.

XIE, Z. et al. Expression of Arabidopsis MIRNA genes. **Plant physiology**, v. 138, n. 4, p. 2145–2154, 2005.

XIE, Z.; KASSCHAU, K. D.; CARRINGTON, J. C. Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in Arabidopsis by microRNA-guided mRNA degradation. **Current biology : CB**, v. 13, n. 9, p. 784–789, 29 abr. 2003.

XIN, M. et al. Diverse set of microRNAs are responsive to powdery mildew infection and heat stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). **BMC plant biology**, v. 10, 24 jun. 2010.

XIONG, L.; ZHU, J. K. Regulation of abscisic acid biosynthesis. **Plant physiology**, v. 133, n. 1, p. 29–36, 1 set. 2003.

XU, T. et al. Cell Surface ABP1-TMK Auxin-Sensing Complex Activates ROP GTPase Signaling. **Science (New York, N.Y.)**, v. 343, n. 6174, p. 1025, 2 fev. 2014.

XUE, B. et al. The 8D05 parasitism gene of *Meloidogyne incognita* is required for successful infection of host roots. **Phytopathology**, v. 103, n. 2, p. 175–181, 2013.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. TRANSCRIPTIONAL REGULATORY NETWORKS IN CELLULAR RESPONSES AND TOLERANCE TO DEHYDRATION AND COLD STRESSES. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105444>, v. 57, p. 781–803, 2 maio 2006.

YAN, J. et al. The miR165/166 Mediated Regulatory Module Plays Critical Roles in ABA Homeostasis and Response in Arabidopsis thaliana. **PLoS Genetics**, v. 12, n. 11, 1 nov. 2016.

YANG, L. et al. Cytosolic glucose-6-phosphate dehydrogenase is involved in seed germination and root growth under salinity in Arabidopsis. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 7 mar. 2019.

YANG, L.; WU, G.; POETHIG, R. S. Mutations in the GW-repeat protein SUO reveal a developmental function for microRNA-mediated translational repression in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 1, p. 315–320, 3 jan. 2012.

YANG, Z. et al. HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. **Nucleic acids research**, v. 34, n. 2, p. 667–675, fev. 2006.

YANT, L. et al. Orchestration of the floral transition and floral development in arabidopsis by the bifunctional transcription factor APETALA2. **Plant Cell**, v. 22, n. 7, p. 2156–2170, 1 jul. 2010.

YIN, Z. et al. microRNA response in potato virus Y infected tobacco shows strain-specificity depending on host and symptom severity. **Virus Research**, v. 260, p. 20–32, 15 jan. 2019.

YOON, E. K. et al. Auxin regulation of the microRNA390-dependent transacting small interfering RNA pathway in Arabidopsis lateral root development. **Nucleic acids research**, v. 38, n. 4, p. 1382–1391, 4 dez. 2010.

YOSHIDA, T. et al. Four Arabidopsis AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic acid signalling in response to osmotic stress. **Plant, cell & environment**, v. 38, n. 1, p. 35–49, 1 jan. 2015.

YOSHIDA, T.; MOGAMI, J.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. **Current opinion in plant biology**, v. 21, p. 133–139, 2014.

YOSHIKAWA, M. et al. A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. **Genes & development**, v. 19, n. 18, p. 2164–2175, 15 set. 2005.

YOSHIKAWA, M. et al. 3' fragment of miR173-programmed RISC-cleaved RNA is protected from degradation in a complex with RISC and SGS3. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 10, p. 4117–4122, 5 mar. 2013.

YU, B. et al. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 307, n. 5711, p. 932–935, 11 fev. 2005.

YU, D. et al. TIR domains of plant immune receptors are 2',3'-cAMP/cGMP synthetases mediating cell death. **Cell**, v. 185, n. 13, jun. 2022.

YU, M. et al. NAC Transcription Factor PwNAC11 Activates ERD1 by Interaction with ABF3 and DREB2A to Enhance Drought Tolerance in Transgenic Arabidopsis. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 13, 1 jul. 2021.

YU, X. et al. Genome-Wide Mapping of Uncapped and Cleaved Transcripts Reveals a Role for the Nuclear mRNA Cap-Binding Complex in Cotranslational RNA Decay in Arabidopsis. **The Plant cell**, v. 28, n. 10, p. 2385–2397, 1 out. 2016a.

YU, Y. et al. Identification and characterization of miRNAs and targets in flax (*Linum usitatissimum*) under saline, alkaline, and saline-alkaline stresses. **BMC Plant Biology**, v. 16, n. 1, p. 1–13, 27 maio 2016b.

YU, Y. et al. Grass phasiRNAs and male fertility. **Science China. Life sciences**, v. 61, n. 2, p. 148–154, 1 fev. 2018.

YUAN, F. et al. OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked Ca²⁺ increases vital for osmosensing in Arabidopsis. **Nature** **2014 514:7522**, v. 514, n. 7522, p. 367–371, 27 ago. 2014.

YUE, B. et al. Genetic Basis of Drought Resistance at Reproductive Stage in Rice: Separation of Drought Tolerance From Drought Avoidance. **Genetics**, v. 172, n. 2, p. 1213–1228, 1 fev. 2006.

YUMUL, R. E. et al. POWERDRESS and Diversified Expression of the MIR172 Gene Family Bolster the Floral Stem Cell Network. **PLOS Genetics**, v. 9, n. 1, p. e1003218, jan. 2013.

ZENG, Q. et al. A new nematocidal compound produced by *Streptomyces albogriseolus* HA10002. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 5, p. 1107–1111, maio 2013.

ZHANG, B. MicroRNA: a new target for improving plant tolerance to abiotic stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 7, p. 1749, 1 abr. 2015.

ZHANG, B. et al. Arabidopsis TOE proteins convey a photoperiodic signal to antagonize CONSTANS and regulate flowering time. **Genes & development**, v. 29, n. 9, p. 975–987, 1 maio 2015.

ZHANG, B.; WANG, Q. MicroRNA, a new target for engineering new crop cultivars. **Bioengineered**, v. 7, n. 1, p. 7–10, 2 jan. 2016.

ZHANG, Q. et al. Characterization of genome-wide microRNAs and their roles in development and biotic stress in pear. **Planta**, v. 249, n. 3, p. 693–707, 8 mar. 2019a.

ZHANG, S. et al. CDC5, a DNA binding protein, positively regulates posttranscriptional processing and/or transcription of primary microRNA transcripts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 43, p. 17588–17593, 22 out. 2013.

ZHANG, W. et al. Phospholipase D in the signaling networks of plant response to abscisic acid and reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1736, n. 1, p. 1–9, 5 set. 2005.

ZHANG, X. et al. Genome-wide analysis of plant nat-siRNAs reveals insights into their distribution, biogenesis and function. **Genome Biology**, v. 13, n. 3, p. 1–16, 22 mar. 2012.

ZHANG, Y. et al. Mechanism for autoinhibition and activation of the MORC3 ATPase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 13, p. 6111–6119, 2019b.

ZHANG, Z. et al. RISC-interacting clearing 3'- 5' exoribonucleases (RICEs) degrade uridylylated cleavage fragments to maintain functional RISC in Arabidopsis thaliana. **eLife**, v. 6, 2 maio 2017.

ZHAO, C. et al. MAP Kinase Cascades Regulate the Cold Response by Modulating ICE1 Protein Stability. **Developmental cell**, v. 43, n. 5, p. 618- 629.e5, 4 dez. 2017.

ZHU, H. et al. Arabidopsis Argonaute10 specifically sequesters miR166/165 to regulate shoot apical meristem development. **Cell**, v. 145, n. 2, p. 242–256, 15 abr. 2011.

ZHU, J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 247–273, 2002.

ZHU, M. et al. Small RNA Sequencing Revealed that miR4415, a Legume-Specific miRNA, was Involved in the Cold Acclimation of Ammopiptanthus nanus by Targeting an L-Ascorbate Oxidase Gene and Regulating the Redox State of Apoplast. **Frontiers in Genetics**, v. 13, 4 abr. 2022.

ZHU, Q. H. et al. miR482 Regulation of NBS-LRR Defense Genes during Fungal Pathogen Infection in Cotton. **PLOS ONE**, v. 8, n. 12, p. e84390, 31 dez. 2013.

ZHU, Q. H.; HELLIWELL, C. A. Regulation of flowering time and floral patterning by miR172. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 2, p. 487–495, 1 jan. 2011.

ZIPFEL, C. et al. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. **Cell**, v. 125, n. 4, p. 749–760, 19 maio 2006.