

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO - UNAERP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

IDENTIFICAÇÃO DE MECANISMOS DE RESPOSTAS MODULADOS
POR MIRNAS EM GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB
TOXICIDADE POR Al^{3+}

JÓICE DE OLIVEIRA LEITE SILVA

RIBEIRÃO PRETO
2020

JÓICE DE OLIVEIRA LEITE SILVA

Identificação de mecanismos de respostas modulados por *miRNAs* em genótipos de cana-de-açúcar sob toxicidade por Al^{3+}

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de mestre pelo programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto.

Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à saúde.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sonia Marli Zingaretti

RIBEIRÃO PRETO
2020

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento Técnico
da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

S586i Silva, Joice de Oliveira Leite, 1996
Identificação de mecanismos de respostas modulados por
miRNAs em genótipos de cana-de-açúcar sob toxicidade por Al^{3+} /
Joice de Oliveira Leite Silva. - - Ribeirão Preto, 2020.
40f.: il.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sonia Marli Zingaretti.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto,
UNAERP, Biotecnologia. Ribeirão Preto, 2020.

1. *miRNAs*. 2. Al^{3+} . 3. Cana-de-açúcar. 4. Rede de
co-expressão. I. Título.

CDD 660

JÓICE DE OLIVEIRA LEITE SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE MECANISMOS DE RESPOSTAS MODULADOS POR
MIRNAS EM GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB TOXICIDADE POR Al³**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

Data da defesa: 27 de julho de 2020

Resultado: Aprovada

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Sonia Marli Zingaretti
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP



Profa. Dra. Bianca Waleria Bertoni
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP



Prof. Dr. Nilson Nicolau Junior
Universidade Federal de Uberlândia - UFU

**RIBEIRÃO PRETO
2020**

DEDICO

Ao meu avô Mario Leite por todo amor, carinho, sabedoria, por cada história e pelos bons momentos proporcionados à nossa família.

“...Foi muita sorte mesmo. Porque de tantas vidas por aí, de tantos caminhos, de tantas possibilidades, você foi existir aqui pertinho de mim...”

(Rafael Magalhães)

AGRADECIMENTOS

À Deus por ser a razão de tudo em minha vida, por cuidar, proteger e me guiar durante toda minha caminhada. Por me proporcionar coragem e força para enfrentar os obstáculos e momentos de dificuldade.

À minha maravilhosa família: mãe Rosi, pai Nilson e irmãos Jéssica, José e Jaqueline, por todo amor, alegria, amizade e apoio durante toda minha vida. Por todos os conselhos, paciência e gentileza.

Aos meus avós Maria Socorro, Floriano e Terezinha por toda sabedoria, amor e cuidado. Pelas boas conversas e histórias que me ensinam muito a cada dia. Desejo-lhes vida longa.

Aos meus amigos Renan Gonçalves da Silva, Lucas de Faria Nogueira, Luana J. Mantovanini, Bruna N. Manfiolli e Caroline Fregonesi, pela amizade, carinho, ensinamentos, conselhos e pelos bons momentos de alegria. Pessoas que vou levar para a vida toda.

Aos meus colegas de Laboratório Mariana, Thiago e Everton pelos conhecimentos compartilhados e ajuda nos momentos de dificuldades.

À minha orientadora Sonia Marli Zingaretti pela orientação, incentivo, por todo conhecimento e aprendizado proporcionado. Por todo apoio e compreensão.

À Universidade de Ribeirão Preto pela oportunidade de realização do curso de mestrado, em especial à Unidade de Biotecnologia pela estrutura para o desenvolvimento do projeto.

A todos os docentes do Programa de pós-graduação em Biotecnologia por todo ensinamento proporcionado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos: MUITO OBRIGADA!

Resumo

A cana-de-açúcar é uma das culturas mais plantadas no país e tem grande importância para a economia brasileira. A elevada demanda na produção de açúcar e etanol promove a expansão da cultura para diferentes regiões, que podem ser desfavoráveis para seu cultivo. Dentre os fatores desfavoráveis está a toxicidade por Al^{3+} que ocorre principalmente em solos ácidos e afetam negativamente a produtividade da cultura. Os efeitos desse estresse incluem, a redução do sistema radicular, alteração da fotossíntese e do metabolismo oxidativo. As plantas possuem mecanismos para responder aos diferentes tipos de estresse, e essas respostas podem incluir aspectos fisiológicos, morfológicos e moleculares. Essa resposta envolve a participação dos *miRNAs* que atuam na regulação de genes alvos e desempenham papéis importantes na tolerância ao estresse. Investigar a função de *miRNAs* e seus genes alvos, por meio do perfil de expressão e análises *in silico*, pode contribuir de maneira significativa para programas de melhoramento genético, que visam aumentar a resistência da cultura ao estresse. O objetivo do trabalho foi a identificação de mecanismos de resposta em genótipos de cana-de-açúcar sob o estresse por Al^{3+} , por meio da expressão de *miRNAs* por RT-qPCR, análise *in silico* e rede de co-expressão. Analisando o perfil de expressão dos *miRNAs*, foi possível observar que houve expressão diferencial entre as cultivares CTC-2 (tolerante) e RB855453 (sensível), indicando que esses cultivares apresentam mecanismos distintos de resposta. Identificamos, através da rede de co-expressão e do perfil de expressão dos *miRNAs*, dois possíveis mecanismos regulados na cultivar CTC-2 sob estresse por Al^{3+} : A detoxificação de Al^{3+} mediada pelo *miR395* e o desenvolvimento de raízes laterais mediado pelos *miR160*, *miR6225-5p* e *miR167*, indicando a participação desses mecanismos na tolerância ao estresse por Al^{3+} .

Palavras-chave: *miRNAs*, Al^{3+} , cana-de-açúcar, rede de co-expressão.

Abstract

Sugarcane is one of the most planted crops in the country and has great importance for the Brazilian economy. The high demand in the production of sugar and ethanol promotes the expansion of culture to different regions, which may be unfavorable for their cultivation. Among the unfavorable factors is Al^{3+} toxicity, which occurs mainly in acidic soils and negatively affect crop productivity. The effects of this stress include, the reduction of the root system, alteration of photosynthesis and oxidative metabolism. Plants have mechanisms to respond to different types of stress, and these responses can include physiological, morphological and molecular aspects. This response involves the participation of *miRNAs* that act in the regulation of target genes and play important roles in stress tolerance. Investigating the function of *miRNAs* and their target genes, through the expression profile and *in silico* analysis, can contribute significantly to genetic improvement programs, which aim to increase the culture resistance to stress. The objective of the work was to identify response mechanisms in sugarcane genotypes under stress by Al^{3+} , through the expression of *miRNAs* by RT-qPCR, *in silico* analysis and co-expression network. Analyzing the expression profile of the *miRNAs*, it was possible to observe that there was a differential expression between the cultivars CTC-2 (tolerant) and RB855453 (sensitive), indicating that these cultivars have different response mechanisms. Through the co-expression network and the miRNA expression profile, we identified two possible mechanisms regulated in the CTC-2 cultivar under stress by Al^{3+} : The detoxification of Al^{3+} mediated by *miR395* and the development of lateral roots mediated by *miR160*, *miR6225-5p* and *miR167*, indicating the participation of these mechanisms in stress tolerance by Al^{3+} .

Keywords: *miRNAs*, Al^{3+} , sugarcane, co-expression network.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Expressão de miRNAs em cana-de-açúcar sob estresse por Al ³⁺	20
Figura 2. Rede de co-expressão individual dos genes alvos.	25
Figura 3. Rede de co-expressão entre os genes SULTR2;1 e AAH.	27
Figura 4. Rede de co-expressão entre os genes ARF17, ACS8 e FBX5.....	30
Figura 5. Mecanismo de tolerância em cana-de-açúcar sob estresse por Al ³⁺	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de nucleotídeos dos primers RT dos miRNAs	16
Tabela 2. Sequência de nucleotídeos dos primers dos miRNAs	17
Tabela 3. Predição dos genes alvos dos miRNAs.....	212
Tabela 4. Anotação funcional e localização subcelular dos genes alvos.	223

LISTA DE ABREVIACOES

- PXMT1**- *Paraxanthine methyltransferase 1*
DRM2- *DNA (cytosine-5)-methyltransferase*
SPL3- *Squamosa promoter-binding-like protein 3*
ACS8- *Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8*
MYB- *Transcription factor MYB*
ARF17- *Auxin response factor 17*
NAC- *NAC domain-containing protein*
ATHB- *Homeobox-leucine zipper protein*
FBX5- *Protein ARABIDILLO*
AAH- *Allantoate deiminase*
AGO1- *Protein Argonaute*
APS4- *ATP sulfurylase 4*
SULTR2- *Sulfate transporter*
K1N12E- *Kinesin-like protein*
KCS5- *ketoacyl-CoA synthase 5*
ABA – *Ácido abscísico*
ROS- *Reactive oxygen species*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1	Cana-de-açúcar	11
2.2	Toxicidade por alumínio (Al ³⁺) e seus efeito no desenvolvimento vegetativo. ...	12
2.3	<i>MiRNAs</i> : Biogênese e seu papel no estresse.....	13
2.4	Rede de co-expressão na identificação de genes.	15
3	OBJETIVOS	15
3.1	Objetivo Geral	15
3.2	Objetivos específicos	15
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1	Material Biológico	16
4.2	Extração do RNA, <i>miRNAs</i> e síntese de <i>cDNA</i>	16
4.3	Análise da expressão dos <i>miRNAs</i>	17
4.4	Seleção de <i>miRNAs</i> para análise <i>in silico</i>	17
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5.1	Expressão de <i>miRNAs</i> em cana-de-açúcar sob estresse por Al ³⁺	18
5.2	Predição dos genes alvos, anotação funcional e localização subcelular	20
5.3	Análise das redes de co-expressão dos genes alvos.....	24
6	CONCLUSÃO.....	34

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma das culturas mais importantes para a economia mundial, sendo o Brasil o maior produtor. A partir da sacarose presente no colmo são produzidos o açúcar cristalizado e o etanol; e como subproduto, sua biomassa (bagaço e palha) é destinada para a produção de bioenergia e em alguns casos também é empregada na alimentação animal. Com o crescimento populacional, há a necessidade de aumentar a produção de alimentos e obter novas fontes de energias. Expandir o cultivo de cana-de-açúcar para as diferentes regiões do país permite aumentar a produção e suprir as necessidades energéticas e de alimento existentes. No entanto, a crescente expansão está associada à exposição da cultura a diferentes fatores adversos, como a seca, salinidade e toxicidade por íons que afetam negativamente o seu rendimento.

A toxicidade por alumínio (Al^{3+}) é um dos principais fatores limitantes da produtividade agrícola em solos ácidos. O alumínio é um dos minerais mais abundantes do solo, e não afeta o crescimento vegetativo em pH neutro ou acima de 7. Todavia, quando o pH do solo atinge valores próximos ou abaixo de 5, as moléculas de Al solubilizam-se e são liberados no meio como íons tóxicos Al^{3+} (WU et al., 2018), que reagem com diversos componentes celulares. Os íons Al^{3+} promovem a redução do sistema radicular impedindo a absorção de água e nutrientes (NOGUEIROL et al., 2015), afetam o aparato fotossintético e provocam alterações no metabolismo oxidativo e molecular das plantas (INOSTROZA-BLANCHETEAU et al., 2011).

Em condições estressantes as plantas desenvolvem mecanismos de respostas aos efeitos adversos. Neste sentido, são capazes de perceber o estresse e produzir diferentes estímulos à nível celular e molecular (JEANDROZ e LAMOTTE, 2017). As alterações a nível molecular incluem a variação na expressão de diferentes genes, fatores de transcrição e *miRNAs*. Os *miRNAs* são pequenos *RNAs* com 20 a 25 nucleotídeos, não codificantes, que atuam ativando ou desligando a transcrição de genes alvos e estão envolvidos em muitos processos metabólicos e crescimento vegetativo (XIE et al., 2015).

As perdas de produtividade decorrentes dos estresses abióticos, incluindo a toxicidade por Al^{3+} , podem ser solucionadas pelos programas de melhoramento genético, que visam o desenvolvimento de cultivares mais tolerantes ao estresse. Para isso, é necessário investigar as respostas de defesa, que podem fornecer informações cruciais sobre a tolerância das plantas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum*), pertence à família das *Poaceae*, que abrange também outras espécies economicamente importantes como o milho (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*), arroz (*Oriza sativa*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) (VETTORE, 2003). A cana-de-açúcar é uma espécie originária do Sul e Sudeste da Ásia, conhecida há séculos pela produção do açúcar cristalizado, a partir da sacarose armazenada em seu colmo.

O avanço das grandes potências coloniais europeias no século XVI proporcionou a disseminação da cultura para regiões do Caribe, América do Sul e Pacífico. No Brasil, em decorrência da crise energética dos anos 70, o cultivo de cana-de-açúcar passou a ter outra vertente de produção, não direcionado apenas para a produção de açúcar, mas também, voltado para a produção de bioetanol. Com a criação do programa Proálcool (1975), boa parte do cultivo de cana passou a ser destinado para a produção de etanol, que elevou a expansão da cultura canavieira para grande parte do território nacional (ZUURBIER e VOOREN, 2008).

As cultivares comerciais modernas são resultado do cruzamento entre *Saccharum officinarum* e *Saccharum spontaneum*. Algumas foram criadas com o propósito de aumentar a resistência à patógenos sem reduzir a produtividade da cultura, os pesquisadores utilizaram a *S. officinarum*, que acumula mais sacarose no colmo e a *S. spontaneum* que é mais resistente a patógenos para criar uma nova cultivar com as duas principais características (SHARMA et al., 2018).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (aproximadamente 530 milhões de toneladas), destacando-se frente a países como Índia, China e Tailândia (FAOSTAT, 2018). E o segundo maior produtor de etanol (USDA, 2019). Estima-se que a produção de cana-de-açúcar no Brasil atinja aproximadamente 630 mil toneladas na safra 2020/2021 (CONAB, 2020). Apesar dos resultados serem bastante promissores, o desenvolvimento da cultura é consideravelmente afetado pelas variações climáticas, principalmente pela baixa precipitação e a ocorrência de geadas.

Ao longo dos anos, as mudanças climáticas têm se intensificado e a frequência das variações tem provocado grandes perdas no rendimento das culturas agrícolas, incluindo a cana-de-açúcar. A grande demanda na produção da cana, resulta na expansão da cultura para regiões muitas vezes desfavoráveis ao seu cultivo, o que pode elevar ainda mais as perdas de produtividade. A fim de sanar essas perdas, os programas de melhoramento genético estão

focados no desenvolvimento de cultivares que possuam maior produtividade sob condições adversas (LAKSHMANAN e ROBINSON, 2013). Para isso, é necessário a compreensão das respostas de tolerância à nível fisiológico, morfológico e molecular.

2.2 Toxicidade por alumínio (Al^{3+}) e seus efeito no desenvolvimento vegetativo.

Solos ácidos ($\text{pH} < 5.5$) são um dos principais fatores responsáveis pela perda de produtividade agrícola. Estima-se que 50% das terras cultiváveis do mundo apresentem solos ácidos e aproximadamente 75% dos solos tropicais da América do Sul apresentam pH de 5,3 (FAGERIA e NASCENTE, 2014). A toxicidade por alumínio (Al^{3+}) é um dos principais fatores que compromete o rendimento das culturas agrícolas (HE et al., 2014). O alumínio (Al) em solos neutros ou levemente ácidos está presente em grande parte como aluminossilicatos insolúveis ou óxidos de alumínio $\text{Al}(\text{OH})_3$ e não apresentam toxicidade. Entretanto, quando o solo atinge pH próximo ou abaixo de 5, o alumínio (Al) é solubilizado na forma fitotóxica $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ ou simplesmente Al^{3+} , tóxico principalmente para as raízes, restringindo a captação de água e nutrientes (GUO et al., 2018).

O Al^{3+} tem a capacidade de interagir com vários componentes intracelulares e extracelulares, como interações com a parede celular (apoplasto), membrana plasmática e citosol (simplasto). Nessa condição, as plantas sofrem diversas alterações morfológicas, fisiológicas e moleculares. A inibição do crescimento radicular é o primeiro efeito provocado pelo Al^{3+} , e pode estar associado à alteração na divisão celular e alongamento (SIVAGURU et al., 2013). Kopittke et al. (2015), demonstraram rápida redução do alongamento das raízes de soja (*Glycine max*), nos primeiros 5 minutos de exposição ao Al^{3+} (75mM), o que pode ter sido causado pela ligação do Al^{3+} às paredes celulares da rizoderme e ao córtex externo.

De maneira geral, as plantas podem expressar dois principais mecanismos de tolerância ao Al^{3+} . O primeiro mecanismo consiste na exclusão do Al^{3+} presente na rizosfera, a partir da exsudação de compostos orgânicos que quelam o Al^{3+} , formando compostos não tóxicos e assim impedindo o contato de íons com as raízes. No segundo mecanismo, os íons Al^{3+} , são absorvidos pelas raízes e passam por um processo de desintoxicação em compartimentos subcelulares. As espécies tóxicas de Al^{3+} , também podem ser translocadas para a parte aérea (KOCHIAN et al., 2015).

O Al^{3+} também interfere no metabolismo oxidativo, aumentando a concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e alterando a expressão de genes antioxidantes (INOSTROZA-BLANCHETEAU et al., 2011). Zhao et al. (2017) observaram um aumento

na atividade das enzimas antioxidantes *superóxido dismutase (SOD)*, *catalase (CAT)* e *ascorbato peroxidase (APX)* em folhas e raízes de milho sugerindo a capacidade de desintoxicação de ROS nas plantas. Em outro estudo foi realizada a identificação de proteínas responsivas ao estresse por Al^{3+} em cultivares contrastantes de sorgo. Foi possível verificar que proteínas envolvidas no metabolismo antioxidante como *superóxido dismutase (SOD)*, *peroxidase (POD)* e *catalase (CAT)* foram mais abundantes no cultivar tolerante (ZHOU et al., 2017).

Em relação à cana-de-açúcar existem poucos estudos que relatam a tolerância desta ao estresse por alumínio. Um estudo que objetivou a seleção de genótipos mais tolerantes ao estresse por alumínio, demonstrou que os genótipos de cana-de-açúcar utilizam mecanismos distintos para tolerar o estresse. Em condições de estresse, foi possível verificar que alguns genótipos modificaram seu sistema radicular, apresentando mais raízes laterais do que primárias. Em relação ao acúmulo de Al^{3+} , enquanto alguns genótipos apresentaram maior conteúdo nas raízes, outros apresentaram maior conteúdo na parte aérea (MAIA et al., 2018).

Watt et al (2003), demonstraram alterações no alongamento radicular em cana-de-açúcar sob estresse por Al^{3+} . Em concentrações baixas de Al^{3+} foi observado um aumento no alongamento radicular, porém em concentrações elevadas houve uma redução do alongamento (15%), sugerindo que as alterações no sistema radicular dependem da concentração de Al^{3+} e do tempo de exposição ao estresse.

2.3 *MiRNAs*: Biogênese e seu papel no estresse.

Os *microRNAs* (ou simplesmente *miRNAs*) são uma classe de pequenos RNAs (20-25 nucleotídeos), endógenos e não codificantes, que regulam a expressão gênica em níveis pós-transcricionais. Os *miRNAs* são moléculas importantes na regulação de vários processos biológicos, como o crescimento, desenvolvimento, metabolismo, bem como nas respostas aos estresses abiótico e biótico (XIE et al., 2015).

A biogênese dos *miRNAs* é bastante complexa e inicia-se no núcleo, com a transcrição do gene do *miRNA* (MIR) pela enzima *RNA polimerase II*, produzindo o transcrito primário (pri-miRNA), com estrutura em “stem-loop” (BUDAK et al., 2015). Os pri-miRNAs são reconhecidos pela enzima *Dicer-Like (DCL)* e então clivados produzindo um *miRNA* precursor (pré-miRNA), que por sua vez forma um complexo duplo *miRNA/miRNA**, contendo a sequência do miRNA e do miRNA complementar* (STEPIEN et al., 2017). O complexo *miRNA/miRNA** é metilado na extremidade 3' pela enzima *Hua Enhancer 1*

(*HENI*), estabilizando-o e evitando sua degradação e em seguida é transportado para o citoplasma. Uma cadeia de *miRNA/miRNA** é incorporada e estabilizada no complexo proteico *RISC* (complexo de silenciamento induzido por RNA), a cadeia guia (*miRNA*) é construída na proteína *Argonaute1*(AGO1), enquanto a cadeia complementar (*miRNA**) é liberada e degradada. Ao final, os *miRNAs* orientam o *RISC* até os genes alvos, através de pareamento de bases e mediam o silenciamento gênico, pela clivagem do alvo e/ou a inibição da tradução proteica (WANG et al., 2019).

Alguns dos *miRNAs* existentes, tornaram-se fortemente conservados ao longo da evolução das plantas, atuando em componentes importantes na regulação dos genes, de modo, a controlar vários processos fisiológicos e de desenvolvimento vegetativo. Muitos desses *miRNAs* conservados controlam a formação de fatores de transcrição (GRAMZOW, et al., 2019). Oito famílias de *miRNAs* foram encontradas conservadas em plantas *Embryophyta*, como o *miR156*, *miR159/319*, *miR160*, *miR390*, *miR166*, *miR171*, *miR395* e *miR408* (CUPERUS et al., 2011).

O *miR390* regula o fator de transcrição *ARF* (*auxin response factor*), responsável pela sinalização de auxina e pelo crescimento de raízes laterais em *Arabidopsis* (MARIN, et al., 2010). Reyes et al. (2007) demonstraram a expressão de fatores de transcrição *MYB* (*transcription factor MYB*) regulado pelo *miR159*, durante a germinação de *Arabidopsis*, bem como atuantes no desenvolvimento floral (LUO, et al., 2013). O *miR164* regula o gene *NAC* (*NAC domain-containing protein*) que participa do processo de senescência foliar e morte celular. Li et al. (2017) demonstraram que o *miR164* desempenha papel importante na senescência de frutos de morango, regulando negativamente seu alvo *NAC*.

Os *miRNAs* também são regulados em resposta a estresses abióticos como seca (AKDOGAN et al., 2016), salinidade (MITTAL et al., 2016) e estresse por metais pesados (GUPTA et al., 2014). Em cana-de-açúcar a identificação de *miRNAs* já foi descrita, em estresses como seca, salinidade e baixa temperatura. Por meio de análise de bioinformática, foram identificados 98 *miRNAs* conservados e 33 novos *miRNAs* em cana-de-açúcar sob estresse salino (BOTTINO et al., 2013). Gentile et al. (2013) realizaram sequenciamento de pequenos RNAs, que permitiu a identificação de 18 famílias de *miRNAs* em cana-de-açúcar sob estresse por seca. Nosso grupo de pesquisa identificou 394 *miRNAs* diferencialmente expressos, em cultivares contrastantes de cana-de-açúcar sob estresse por alumínio, 104 *miRNAs* diferencialmente expressos eram específicos para a cultivar tolerante (CTC-2) e 116 *miRNAs* específicos para a cultivar sensível (RB855453) e 87 *miRNAs* comuns entre as cultivares (SILVA et al., 2019).

2.4 Rede de co-expressão na identificação de genes.

As análises *in silico* contribuem consideravelmente para as pesquisas atuais. A realização de análises *in silico* em conjunto com estudos biológicos, são muito importantes na compreensão e exploração de mecanismos regulados durante o estresse. Em especial, as redes de co-expressão permitem avaliar a interação genética entre genes, como interação por co-expressão e co-localização.

Através de rede de co-expressão foi possível identificar alguns fatores de transcrição associados à biossíntese da parede celular em cana-de-açúcar, favorecendo estudos que visam o aumento da produção de biocombustíveis (FERREIRA et al., 2016). Ransbotyn et al., 2014, combinaram a expressão de vários genes de *Arabidopsis* com a análise de rede de co-expressão de *RNA* responsivos a múltiplos estresses como salinidade, frio, estresse hídrico e outros, para selecionar genes candidatos na tolerância de múltiplos estresses.

Em plantas de arroz, foi realizada a análise de rede de co-expressão do transcriptoma em raízes sob condições de estresse por cádmio, identificando vários genes funcionais chave regulados pelo estresse por cádmio (TAN et al., 2017). Genes envolvidos no processo biossintético de clorofilas, foram identificados através da análise de rede de co-expressão em plantas de arroz, indicando que esses genes participam da tolerância ao estresse salino (NOUNJAN et al., 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito de 10 *miRNAs* selecionados no processo de tolerância ao alumínio nos cultivares CTC-2 (tolerante) e RB855453 (sensível) de cana-de-açúcar por meio de RT-qPCR, análise *in silico* e rede de co-expressão.

3.2 Objetivos específicos

- i. Validação de *miRNAs* por RT-qPCR.
- ii. Seleção dos *miRNAs* submetidos à análise *in silico*: predição dos genes alvos, anotação funcional e construção de rede de co-expressão.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Biológico

Em trabalho anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa, duas cultivares de cana-de-açúcar foram determinadas como tolerante (CTC-2) e sensível (RB855453) ao estresse por alumínio (Al^{3+}) (MANTOVANINI et al. 2017). Mudanças dos dois genótipos pré-brotados em recipiente plástico de 700 ml contendo substrato comercial (Carolina soil®) durante 60 dias, foram transferidas para caixas contendo 12 L de solução nutritiva (HOAGLAND & ARNON, 1975) e mantidos em casa de vegetação sob condições de temperatura e umidade controladas. Após 20 dias de aclimação em sistema hidropônico, foi adicionado à solução nutritiva o cloreto de alumínio hexahidratado ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$) na concentração de $221 \mu mol L^{-1}$. O pH da solução foi monitorado e mantido a 4,5, mantendo a estabilidade da molécula de Al na sua forma tóxica (Al^{3+}). As amostras de raízes (todo o sistema radicular) utilizadas no presente trabalho foram coletadas após 7 dias de estresse e armazenadas em freezer $-80^\circ C$ para posterior extração do RNA e *miRNAs*.

4.2 Extração do RNA, *miRNAs* e síntese de *cDNA*

Os *miRNAs* foram extraídos utilizando o “mirVana MiRNA Isolation kit” (Ambion), a partir do RNA total, seguindo as recomendações do fabricante. O RNA foi quantificado em “Nanodrop” e sua qualidade avaliada em gel de agarose desnaturante. O *cDNA* foi sintetizado utilizando-se o kit “RevertAid First Strand cDNA Synthesis” (Thermo Scientific), de acordo com as recomendações do fabricante. Para a síntese foi adicionado à reação os primers RT (primers longos de extensão em *stem-loop*) (Tabela 1).

Tabela 1. Sequência de nucleotídeos dos primers RT dos *miRNAs*

<i>miRNAs</i>	Primers RT
miR160	5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCGGCAT 3'
miR395	5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGGAGTT 3'
miR6225-5p	5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGAGATG 3'

4.3 Análise da expressão dos *miRNAs*

A quantificação da expressão dos *miRNAs* foi realizada utilizando o kit "SYBR Green Jump Start Taq Ready Mix" (Sigma Aldrich), pelo método de *stem-loop* RT-qPCR descrito por Varkonyi-Gasic (2011), utilizando primers *forward* específicos para cada *miRNA* e o primer *reverse* comum para todos os *miRNAs* (universal). Na Tabela 2, estão descritas as sequências de nucleotídeos que compõem os primers *forward* e o primer *reverse* universal.

O gene constitutivo *18SrRNA* foi utilizado como normalizador da reação. Os parâmetros de ciclagem utilizados para a análise por RT-qPCR foram: 94°C - 2 minutos; 94°C - 15 segundos; 60°C - 1 minuto; 72°C - 30 segundos, repetido por 40 vezes. Posteriormente, foi construída uma curva de dissociação baseada em: 95°C-1 minuto; 55°C-30 segundos e 95°C-30 segundos. Os níveis de expressão dos *miRNAs* foram analisados utilizando o software "MxPro QPCR Software versão 4.10" (Stratagene). Os valores de expressão relativa foram estabelecidos pela razão entre a expressão do gene alvo e o controle, neste caso considerado 1.

Tabela 2. Sequência de nucleotídeos dos primers dos *miRNAs*

MiRNAs	Primer Forward (5'-3')
miR160	CGATGCCTGGCTCCCTGT
miR395	CGCCTGAAGTGTTTGGGGG
miR6225	CGCCGCAACTAGACTCAAAGAA
Universal	CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA

18SrRNA: Forward- CTACGTCCCTGCCCTTTGTACA
Reverse- ACACTTCACCGGACCATTCAA

4.4 Seleção de *miRNAs* para análise *in silico*

Para a análise *in silico* foram selecionados *miRNAs* envolvidos no estresse por alumínio. Foram submetidos à análise *in silico* três *miRNAs* validados no presente trabalho, o *miR395*, *miR160* e *miR6225-5p*; sete *miRNAs* validados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa: o *miR121*, *miR156*, *miR159*, *miR167*, *miR168* e *miR6253* avaliados por SILVA et al. (2019) e o *miR164* avaliado por MANTOVANINI, 2017.

A sequência madura dos *miRNAs* foram obtidas do banco de dados *miRBASE* e submetidas à análise *in silico*. A predição dos genes alvos (targets) regulados pelos *miRNAs* foi realizada utilizando os softwares "psRNA target" (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>) e WMD3-Web microRNA Designer 3.1

(<http://wmd3.weigelworld.org/>). A anotação funcional e localização subcelular foram obtidas pelos softwares “Gene Ontology” (<http://geneontology.org/>) e Uniprot (<https://www.uniprot.org/>), respectivamente. A construção da rede de co-expressão foi realizada pelo software “Gene Mania” (<https://genemania.org/>) a partir dos parâmetros disponíveis pela ferramenta (Interação física, predição, co-expressão, domínio proteico, interação genética e co-localização). Todas as análises *in silico* foram realizadas utilizando nos bancos de dados o genoma referência de *Arabidopsis thaliana*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Expressão de *miRNAs* em cana-de-açúcar sob estresse por Al^{3+}

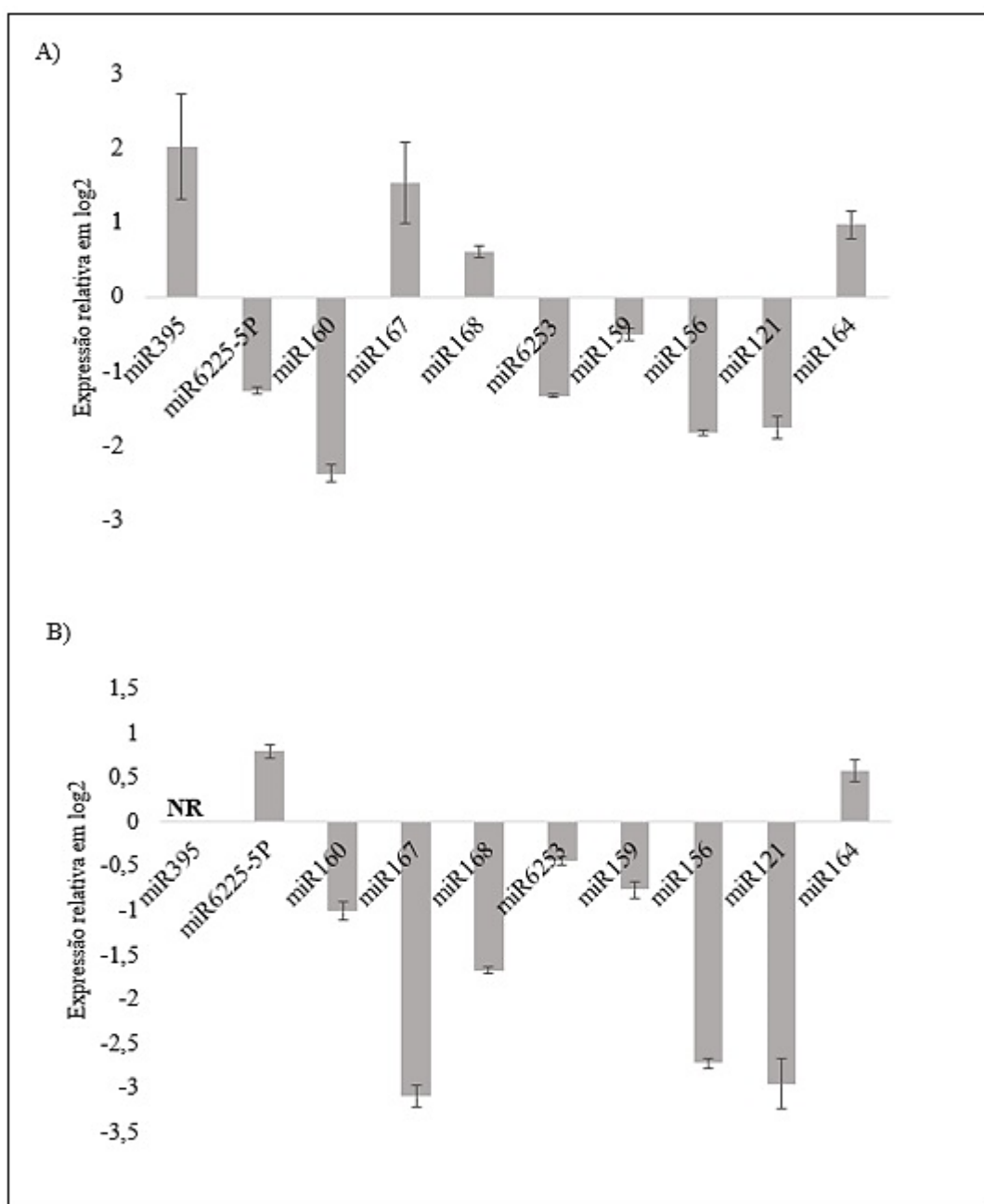
Os dados de expressão dos *miRNAs* validados nos outros trabalhos foram compilados no mesmo gráfico para melhor compreensão dos resultados. A expressão dos *miRNAs* nas cultivares CTC-2 e RB855453 estão apresentados na Figura 1. Analisando os gráficos de expressão foi possível verificar que houve expressão diferencial dos *miRNAs* entre as cultivares no estresse por alumínio. Os *miRNAs* *miR167* e *miR168* foram regulados positivamente na cultivar CTC-2 e regulados negativamente na cultivar sensível RB855453. O *miR395* também foi induzido na cultivar CTC-2, porém não foi responsivo na cultivar RB855453. O *miR6225-5p*, por outro lado, foi regulado negativamente na CTC-2 e induzido na RB855453 (Figura 1).

Gao et al. (2019), também demonstraram a expressão diferencial de *miRNAs* em plantas de milho expostas a metais pesados, como o alumínio (Al) e cádmio (Cd). O *miR395* e *miR167*, por exemplo, foram regulados positivamente frente ao estresse por Al^{3+} , enquanto o *miR159* e *miR160* foram reprimidos no estresse por Al e Cd. O *miR395* também foi induzido no tratamento com dióxido de enxofre (SO_2) em plantas de *Arabidopsis*, consequentemente levando a uma diminuição nos níveis de expressão de seus genes alvos a *ATP sulfurilase* e o transportador e assimilador de sulfato de baixa afinidade (*SULTR2;1*), indicando desse modo, a participação do *miR395* na proteção contra os danos oxidativos sob estresse por SO_2 (Li et al. 2017). Zhang et al. (2013) estudaram a regulação de *miRNAs* sob estresse salino em folhas e raízes de *Thellungiella salsuginea* e mostraram a indução do *miR168a*, *miR395a* e *miR395b* nas raízes, indicando a participação desses *miRNAs* na tolerância ao estresse salino.

Os *miRNAs* *miR160*, *miR159*, *miR156*, *miR121* e *miR6253* foram regulados negativamente nas duas cultivares. No entanto, é possível verificar que houve diferença entre

os níveis de repressão desses *miRNAs* (Figura 1). O *miR160*, por exemplo, foi mais reprimido na cultivar CTC-2 em comparação a RB855453, isso sugere que os níveis de expressão do seu gene alvo o *fator de resposta a auxina (ARF)* está mais induzido na cultivar tolerante (CTC-2). Dubey et al. (2020) demonstraram resultados similares em plantas de arroz sob estresse por cromo (Cr), indicando que a regulação negativa do *miR160* pode estar provocando um aumento no nível de auxina mediado por *ARF* em resposta ao estresse por Cr. O *miR160* também foi reprimido em genótipo tolerante de cevada sob estresse por alumínio, demonstrando que o *miR160* associado a via de sinalização de auxina responde ao estresse por alumínio como estratégia de desintoxicação (WU et al., 2018).

Figura 1. Expressão de miRNAs em cana-de-açúcar sob estresse por Al³⁺



A) Cultivar CTC-2 (tolerante) B) Cultivar RB855453 (sensível). **NR**= Não responsivo.

5.2 Predição dos genes alvos, anotação funcional e localização subcelular

A predição dos genes alvos utilizando as ferramentas: *PsRNA target* e *WMD3* e o tipo de inibição realizada pelos *miRNAs*, estão descritos na Tabela 3. É possível verificar que a maioria dos *miRNAs* realizam inibição por clivagem e apenas o *miR6225-5p* silencia seus genes alvos inibindo a tradução da proteína. De acordo com as duas ferramentas de predição utilizadas, o *miR156* regula um gene *Squamosa promoter binding like protein 3 (SPL3)*, o *miR159* regula um fator de transcrição (*transcription factor MYB*), o *miR160* regula o gene

Auxin response factor (ARF17), o gene *NAC-domain containing protein (NAC)* é possivelmente regulado por *miR164* e o *miR395* regula o gene *sulfate transporter 2.1 (SULTR2;1)*. A ferramenta *WMD3* não apresentou resultados na predição dos alvos para o *miR121*, *miR167*, *miR168* e *miR6225-5p* (Tabela 3).

Na Tabela 4, está apresentada a anotação funcional dos genes alvos e sua localização subcelular. É possível verificar que dos 10 *miRNAs* analisados, quatro deles (*miR121*, *miR156*, *miR168* e *miR395*), regulam genes que possuem função de ligação a íons de metal ou participam no processo de transporte e estão envolvidos no silenciamento gênico, na diferenciação celular e no desenvolvimento de raízes adventícias. Esses genes podem ser encontrados em diferentes componentes celulares como o núcleo, retículo endoplasmático, citoplasma, membrana e cloroplastos.

Os genes *AAH* e *AGO1* regulados pelo *miR168*, estão envolvidos no processo da ureia, no desenvolvimento de raízes adventícias e no metabolismo de auxina, são encontrados no retículo endoplasmático e citosol. O *miR395* regula os genes *APS4* e *SULTR2;1*, que estão envolvidos na assimilação e transporte de sulfato. Os *miRNAs* *miR159*, *miR160* e *miR167* regulam os genes *ACS8*, *ARF17* e *FBX5*, respectivamente que estão envolvidos no metabolismo de fitohormônios como, o etileno e auxina e participam do desenvolvimento de raízes laterais e adventícias. Além disso, esses genes podem ser encontrados no núcleo e retículo endoplasmático. O *miR6253* regula os genes *KCS5* e *ATHB9*, que estão envolvidos no processo de biossíntese dos ácidos graxos. O *miR6225-5p*, regula o gene *KIN12E (Kinesin like protein)* que está envolvido com a movimentação de microtúbulos e *SIT4* que desempenha função de fosfatase.

Tabela 3. Predição dos genes alvos dos *miRNAs*

<i>miRNA</i>	SEQUÊNCIA	PsRNA target	WMD3	INIBIÇÃO
miR121	CGCUGCAGCGCUGAAGUAUGAG	PXMT1 DRM2	SR	Clivagem
miR156	UGACAGAAGAGAGUGAGCACA	SPL3	SPL3	Clivagem
miR159	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUG	ACS8 MYB101	MYB104	Clivagem
miR160	UGCCUGGCUCCUGUAUGCCG	ARF17	ARF17	Clivagem
miR164	UGGAGAAGCAGGGCACGUGCA	NAC080	NAC	Clivagem
miR167	AGGUCAUGCUGUAGUUUCAUC	ATHB6 <i>Alpha/beta-hydrolase</i> FBX5	SR	Clivagem
miR168	UCGCUUGGUGCAGAUCCGGAC	AAH AGO1	SR	Clivagem
miR395	CUGAAGUGUUUGGGGAACUCC	APS4 SULTR2	SULTR2	Clivagem
miR6225-5p	AACUAGACUCAAAGAUUCAUCUC	KIN12E SIT4	SR	Tradução
miR6253	GAGGAAAGUGGGCAGUUGGGUU	KCS5 ATHB-9	<i>WEB family protein</i>	Clivagem

Softwares: *PsRNA target* e *WMD3* SR= Sem Resultado

Tabela 4. Anotação funcional e localização subcelular dos genes alvos.

miRNA	Targets	Função Molecular*	Processo Biológico*	Localização#
miR121	PXMT1 DRM2	Ligação com metal e metiltransferase	Silenciamento gênico	Núcleo
miR156	SPL3	Ligação a íons metal e ligação ao DNA	Diferenciação celular desenvolvimento de flores e transcrição	Núcleo e citoplasma
miR159	ACS8 MYB101	Atividade catalítica/ ligação a proteínas Ligação a fatores de transcrição	Envolvido na biossíntese de etileno Diferenciação celular	Núcleo
miR160	ARF17	Ligação a fator de transcrição	Desenvolvimento de raízes adventícias e sinalização de auxina	Núcleo
miR164	NAC080	Ligação a DNA e fatores de transcrição	Regulação da transcrição	Núcleo
miR167	ATHB6 <i>Alpha/beta-hydrolase</i> FBX5	Ligação a DNA e fatores de transcrição.	Ativação via ABA e regulação negativa de ABA Desenvolvimento de raízes laterais	Núcleo e membrana plasmática
miR168	<i>AAH</i> <i>AGO1</i>	Ligação a íons metal e a metalopeptidase; atividade de endonuclease.	Envolvido com processo da ureia, desenvolvimento de raízes adventícias, metabolismo de auxinas	Retículo, núcleo e citosol
miR395	APS4 SULTR2	Ligação a ATP; Transporte transmembranar de sulfato.	Assimilação e transporte de sulfato	Cloroplasto e membrana
miR6225-5p	KIN12E SIT4	<i>ATPase</i> , ligação a ATP, ligação de microtúbulos; fosfatase	Envolvido no movimento de microtúbulos	Citoesqueleto
miR6253	KCS5 ATHB-9	Aciltransferase; Transferase; Ligação ao DNA e a Lipídeos.	Envolvido na biossíntese de ácidos graxos; Diferenciação celular	Retículo e membrana

*Gene Ontology

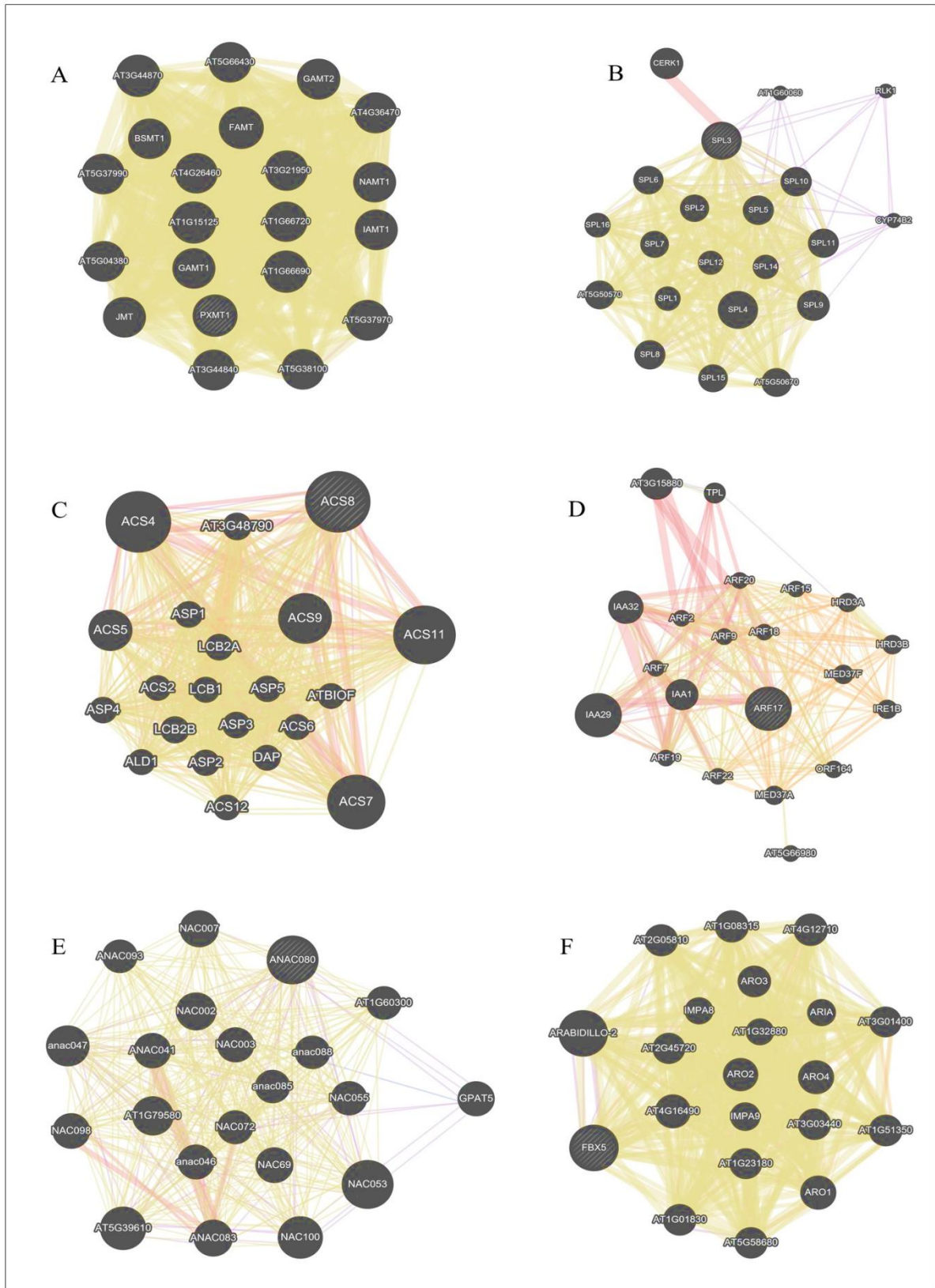
#Uniprot

5.3 Análise das redes de co-expressão dos genes alvos

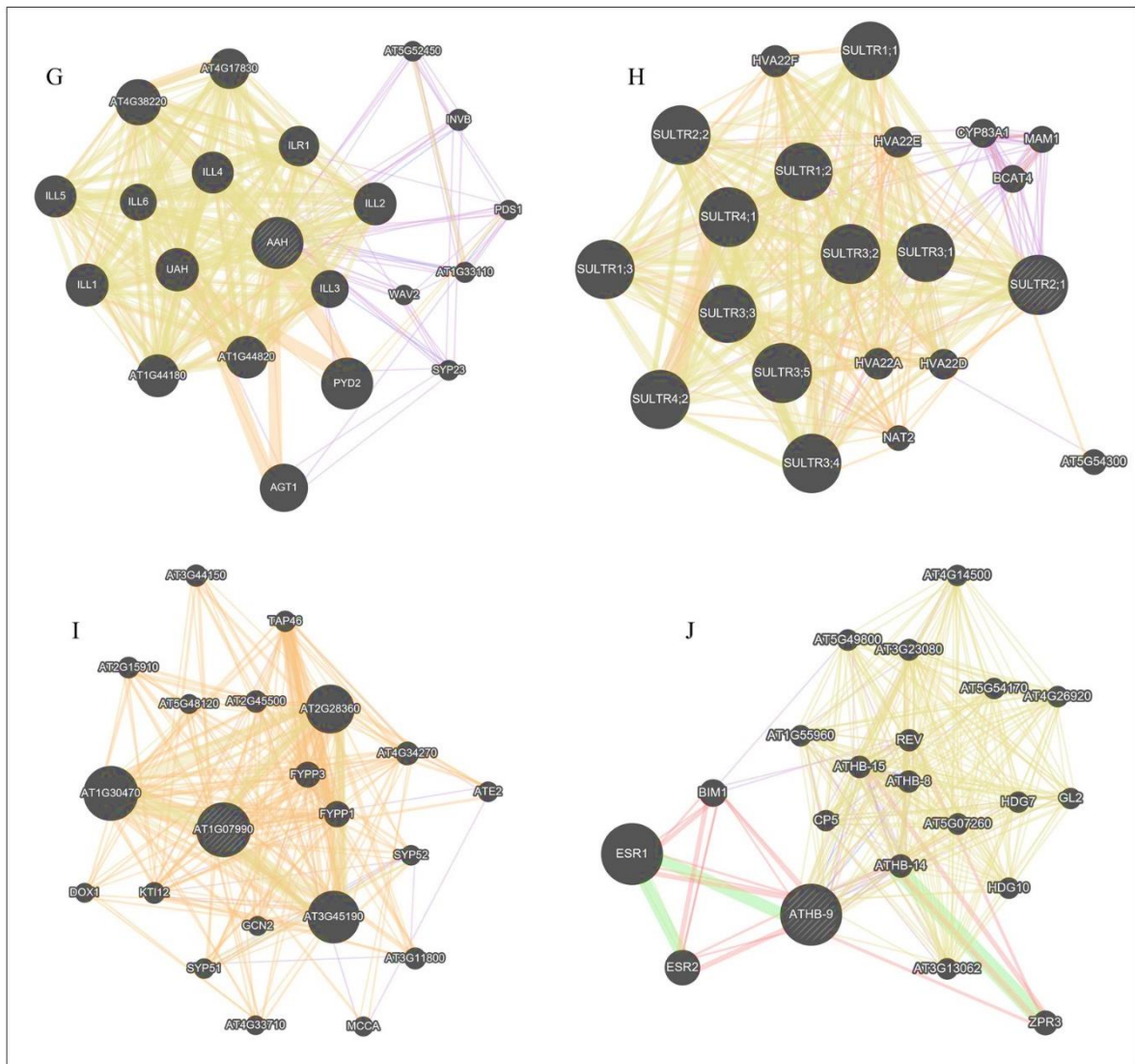
Os *miRNAs* são capazes de regular vários genes alvos, que podem estar envolvidos em diferentes processos biológicos. De acordo com suas funções e processos envolvidos, selecionamos apenas um gene alvo para cada *miRNA*: *PXMT1*- *miR121*, *SPL3*- *miR156*, *ACS8*- *miR159*, *ARF17*- *miR160*, *NAC080*- *miR164*, *FBX5*- *miR167*, *AAH*- *miR168*, *SULTR2;1*- *miR395*, *SIT4*- *miR6225-5p* e *ATHB-9*- *miR6253*. A rede de co-expressão correlaciona genes que possuem interações genéticas e associa a co-expressão e co-localização entre eles. Assim é possível analisar os genes de acordo com suas interações e processos envolvidos.

Redes individuais para cada gene alvo foi gerada pelo software GENEMANIA, seguindo os parâmetros disponíveis pela ferramenta. Os genes alvos estão envolvidos em diferentes processos biológicos. Na biossíntese de etileno (*ACS8*), via de sinalização de auxinas (*ARF17*), processo de diferenciação celular (*SPL3* e *ATHB-9*), bem como, envolvidos no desenvolvimento de raízes laterais e adventícias (*ACS8*, *ARF17* e *FBX5*), na ligação a íons de metal *PXMT1*, *SPL3*, *AAH* e *SULTR2;1*, entre outros processos (*SIT4* e *NAC080*). Cada círculo representa um gene dentro da rede e o tipo de interação entre eles é determinado pelas diferentes linhas. A interação de co-expressão entre os genes é observada pela presença da linha roxa. Analisando as redes é possível verificar que a co-expressão ocorre nas redes de *SPL3*, *ARF17*, *NAC080*, *AAH*, *SULTR2;1*, *SIT4* e *ATHB-9* (Figura 2).

Figura 2. Rede de co-expressão individual dos genes alvo.



Continuação figura 2



(A)-*PXMT1*, (B)-*SPL3*, (C)-*ACS8*, (D)-*ARF17*, (E)-*NAC080*, (F)-*FBX5*, (G)-*AAH*, (H)-*SULTR2;1*, (I)-*SIT4*, (J)-*ATHB9*. Fonte: GENEMANIA

Para investigar a participação dos possíveis genes alvos no mecanismo de detoxificação, foi realizada uma rede conjunta com os genes *AAH* e *SULTR2;1* (Ligação com metais pesados) e com o gene *MATE* (*Multidrug and toxic compound extrusion transporter*) conhecido por participar do processo de detoxificação.

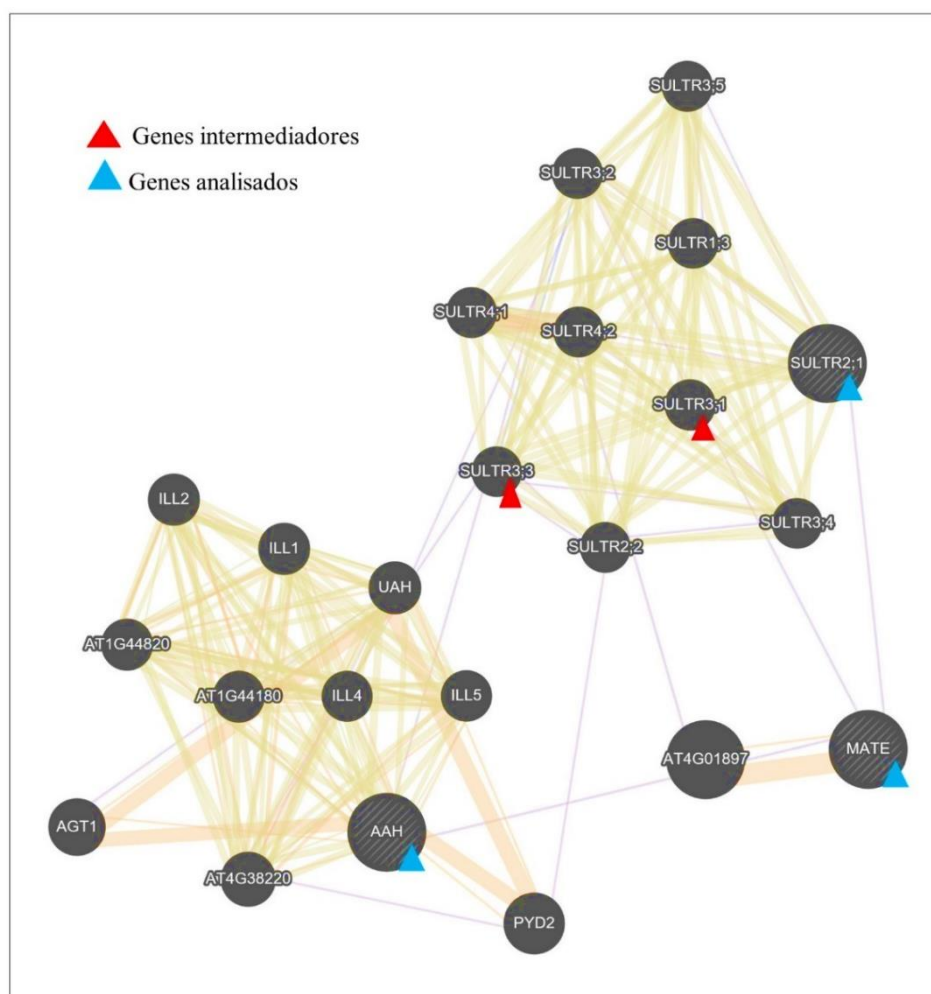
Analisando a rede conjunta é possível verificar que os genes alvos *AAH* e *SULTR2;1* interagem com o gene *MATE*. Alguns membros da família *MATE* estão envolvidos na detoxificação do Al^{3+} em diferentes plantas e são responsáveis por liberar citrato (quelante de Al) das raízes para a rizosfera em resposta ao estresse por Al^{3+} (MA et al., 2018).

O *SULTR2;1* é um transportador de baixa afinidade pelo sulfato, expresso em estruturas de raízes (periciclo) de plantas vasculares e células do xilema. Esse transportador é responsável pela captação e transporte de sulfato para o espaço apoplástico de células

periciclo e células do xilema, mantendo o fluxo de sulfato direcionado para o xilema (DING et al., 2016; TAKAHASHI, 2019). Na rede esse gene interage diretamente com o gene *MATE* e com outros genes *SULTRs* (*sulfate transporter*). Os *SULTR3;1* e *SULTR3;3* foram denominados genes intermediadores, pois permitem a interação entre as redes. Enquanto o *SULTR3;1* interage com o gene *MATE*, o *SULTR3;3* interage com o gene *AAH*.

GUO et al (2017), demonstraram a participação de genes envolvidos no transporte e metabolismo de enxofre S (*SULTRs*) na tolerância ao estresse por alumínio em plantas de citrus. A cultivar mais tolerante ao estresse por Al^{3+} apresentou maior nível de enxofre nas raízes e folhas, possivelmente pelo aumento da absorção e diminuição da exportação de S, contribuindo para a detoxificação do Al^{3+} . Além disso, as plantas tolerantes apresentaram maior capacidade de desintoxicação externa, mediado pelo aumento da secreção de citrato e malato. A interação do gene *SULTR2;1* com o gene *MATE* sugere sua participação no processo de detoxificação do Al^{3+} , através do controle do fluxo de sulfato (Figura 3).

Figura 3. Rede de co-expressão entre os genes *SULTR2;1* e *AAH*.



FONTE: GENEMANIA

O gene *AAH* (*allantoate deiminase*), por sua vez, tem função de ligação com íons de metal e de metalopeptidase, participa da via de degradação de alantoína e no catabolismo de ureide. Esse gene também interage diretamente com o gene *MATE*, com três genes *IAAs* (metabolismo de auxina), *ATG1* e *PYD2* (metabolismo de amino ácidos e fotorrespiração) (Figura 3). Já foi demonstrado que o acúmulo de alantoína pode proteger as plantas, reduzindo os danos oxidativos (IRANI, et al., 2016 e NOURIMANDI, et al., 2016). Em *Arabidopsis*, houve um aumento de alantoína sob toxicidade por cádmio (Cd), sugerindo aumento de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase e ascorbato peroxidase (NOURIMANDI, et al., 2016).

As análises *in silico* do gene *AAH* (*miR168*) mostraram que este desempenha função de ligação à íons de metal, além disso interage com o gene *MATE*. No entanto nenhum trabalho relata a relação desse gene com o estresse por Al^{3+} , parece que este ativa outros mecanismos de resposta, como por exemplo o sistema antioxidante. Neste sentido, podemos sugerir que a interação de *AAH* com os genes *SULTR2;1* e *MATE*, observado na rede de co-expressão, não está envolvido no processo de detoxificação do Al^{3+} e sim na ativação do sistema antioxidante como resposta ao estresse por Al^{3+} .

Além da detoxificação do Al^{3+} o desenvolvimento de raízes laterais, também é um importante mecanismo de tolerância ao estresse por Al^{3+} . Na figura 4 está apresentada a rede de co-expressão integrada entre os genes *ARF17*, *ACS8* e *FBX5*, envolvidos no desenvolvimento de raízes laterais. É possível observar que os genes estão interagindo entre as redes.

O *ARF17* (*Auxin response factor*), localizado no núcleo, está envolvido em muitos processos biológicos, participa da via de sinalização ativada por auxina, do desenvolvimento de raízes adventícias, desenvolvimento de pólen e na deposição de calos na parede celular (NCBI Id: 844120). Na rede, o *ARF17* interage com genes *IAA* (*Auxin responsive protein*) envolvidos no metabolismo de auxina, dois tipos de *HSP* (*Heat shock protein*) envolvidos na resposta a íons de cádmio, resposta a estresse por altas temperaturas e na resposta de estresse no retículo endoplasmático. Interage também com gene *LCB* (*long chain base*), envolvido na via biossintética de moléculas lipídicas, na regulação da morte celular e no desenvolvimento embrionário (Figura 4).

Além disso, *ARF17* interage com gene da proteína *TPL* (*protein TOPLESS*) que têm função de ligação a proteínas e está envolvido na via de sinalização do ácido jasmônico e em resposta a auxina, outros genes como *WUS* (processo de homeostase do ácido giberélico), *HRD3* (resposta à salinidade) e *IRE* (ligação e clivagem do RNA) também interagem com *ARF17*. Os genes *IAA*, *LCB* e *TPL* são os intermediadores dessas redes, enquanto *IAA* e *LCB*

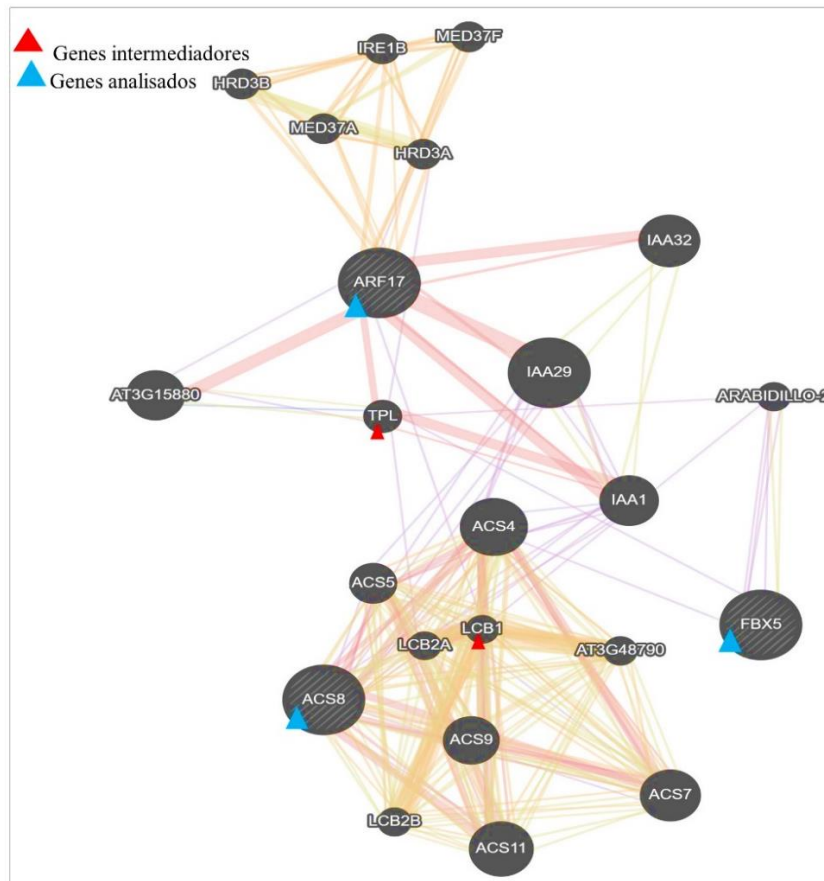
permite a interação entre *ARF17* e *ACS8*, o gene *TPL* permite a interação de *ARF17* e *FBX5* (Figura 4).

O *FBX5* regula uma proteína *ARABIDILLO1* presente no núcleo e têm como principal função fazer ligação com proteínas, além de estar envolvido no desenvolvimento de raízes laterais (NCBI Id: 819099). Interage com outra proteína *ARABIDILLO 2*, que desempenha as mesmas funções e com o gene *TPL* presente também na rede de *ARF17*. O gene *FBX5* também interage com o gene *ACS4* presente na rede de *ACS8* (Figura 4).

O *ACS8* (*1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase 8*), por sua vez, está envolvido na via biossintética do etileno e possui função de ligação a proteínas (NCBI Id: 829933), interage com outros cinco genes *ACS* (*ACS4*, *ACS5*, *ACS7*, *ACS9* e *ACS11*) e com os genes *LCB* (*LCB2B*, *LCB2A* e *LCB1*) e *IAA* (*IAA1* e *IAA29*), também presentes na rede de *ARF17*, descritos acima. (Figura 4). O fitohormônio etileno é o mais associado a auxina na alteração da morfologia e arquitetura das raízes, ele regula o crescimento radicular, aumentando a biossíntese e o transporte de auxina. Isso demonstra que a ação integrada entre esses hormônios é fundamental para o desenvolvimento de raízes laterais (ROWE et al., 2016; LIU et al., 2017).

Durante a privação de fósforo (P) em *Arabidopsis*, foi verificado a expressão de genes envolvidos no metabolismo de auxinas (*ARFs*) e genes pertencentes à via biossintética do etileno (*ACS*) na formação de raízes laterais (SUN et al., 2016). Essas informações explicam a interação de *ARF17* e *ACS8* na rede de co-expressão. O gene *FBX5* interage por co-expressão tanto com genes envolvidos na via de auxina (*ARF17*) como na via do etileno (*ACS8*), supostamente a interação entre esses genes ativam em conjunto a formação de raízes laterais como resposta ao estresse por Al^{3+} .

Figura 4. Rede de co-expressão entre os genes ARF17, ACS8 e FBX5.



FONTE: GENEMANIA

Os dados de expressão dos *miRNAs* em conjunto com as redes de co-expressão possibilitam a compreensão de possíveis mecanismos de tolerância ao estresse por Al^{3+} em cana-de-açúcar. Neste estudo, identificamos dois possíveis mecanismos regulados na cultivar CTC-2 (tolerante) durante o estresse por Al^{3+} : O processo de detoxificação mediado pelo *miR395* e seu gene alvo *SULTR2;1* e o desenvolvimento de raízes laterais mediado pelos *miRNAs* (*miR160*, *miR6225-5p* e *miR167*) e seus respectivos alvos *ARF17*, *KIN12E* e *FBX5* (Figura 5).

A detoxificação ou exclusão do Al^{3+} através das raízes é um dos principais mecanismos de tolerância ao estresse por Al^{3+} (KOCHIAN, 2015). O estresse por alumínio associado com a privação de sulfato permite a complexação do Al com o sulfato, formando o $AlSO_4^+$ (ALARCÓN-POBLETE et al. 2018) esse complexo pode estar envolvido na detoxificação de Al^{3+} (VERA-VILLALOBOS et al., 2020). Durante a privação de sulfato, os íons de sulfato (SO_4^{2-}) são absorvidos e translocados pelas proteínas de membrana-transportadoras de sulfato (SULTRs), que adentram os compartimentos celulares e

subcelulares através das bicamadas lipídicas da membrana, controlando o fluxo de SO_4^{2-} (TAKAHASHI et al., 2019).

O *miR395* regula o gene *SULTR2;1*, que está envolvido na translocação de SO_4^{2-} das raízes para a parte aérea (CAPALDI et al., 2015). Está bem estabelecido a indução do *miR395* durante a privação de sulfato e conseqüentemente a repressão de *SULTR2;1* (JAGADEESWARAN et al., 2014). Além de participarem da translocação de sulfato das raízes para a parte aérea, o *SULTR2;1* também transporta o sulfato entre as folhas. LIANG e YU (2010) demonstraram que a indução do *miR395* possivelmente reprimindo o *SULTR2;1*, limita o transporte de sulfato de folhas maduras para folhas jovens em *Arabidopsis*.

A partir disso, podemos sugerir que, a repressão de *SULTR2;1*, mediada pelo *miR395* pode estar interrompendo o fluxo de sulfato e do complexo AlSO_4^+ das raízes para a parte aérea, assim mantendo o fluxo de sulfato e a possível detoxificação do Al^{3+} pelas raízes na cultivar CTC-2 (Figura 5).

Pode-se observar que três dos miRNAs estão participando do desenvolvimento de raízes laterais. O gene *KIN12E* regulado pelo *miR6225-5p*, pertence à família das kinesinas-12, proteínas motoras de microtúbulos, que desempenham papel crucial no desenvolvimento das plantas, atuando principalmente a nível celular na organização de microtúbulos e expansão de fragmoplastos (estruturas celulares) e na divisão celular (NEBENFÜHR e DITIX, 2018). Müller e Livanos (2019) revisaram o papel da subfamília de Kinesin-12, mostrando que muitos membros dessa família são necessários para a estabilidade e expansão de fragmoplastos e para o desenvolvimento da placa celular.

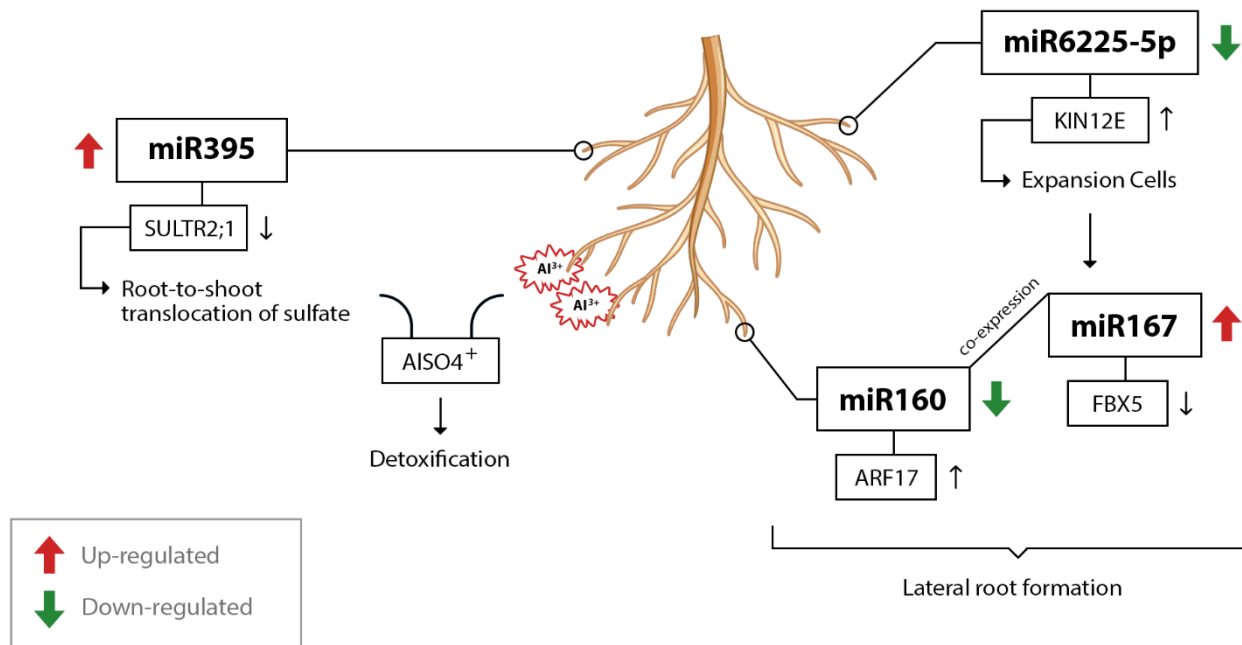
O gene *KIN12E* ainda não é bem explorado, porém, um estudo do perfil de transcrição, mostrou a indução desse gene durante a mitose, sugerindo sua participação na divisão celular (VANSTRAELEN et al., 2006). No esquema proposto, podemos observar que *KIN12E* está possivelmente induzido na cultivar CTC-2, assim ativando o processo de expansão celular e contribuindo para a formação de raízes laterais mediado pelo *miR160* e *miR167*.

O *miR160* desempenha papel crucial na formação de raízes adventícias e seu gene alvo *ARF17* participa do controle da embriogênese e do desenvolvimento radicular (LI et al., 2019; ZHANG et al., 2020). Além do *ARF17* a proteína *ARABIDILLO* regulado pelo gene *FBX5*, também está envolvido no desenvolvimento de raízes laterais. Nibau et al. (2011) demonstraram que homólogos da proteína *ARABIDILLO* são conservados no reino vegetal e que as plantas que não possuem ou superexpressam *ARABIDILLO1* respondem normalmente a sinais reguladores de raiz lateral conhecidos, como auxina, citocinina e ABA, ou seja, sua função não é afetada pelos sinais hormonais.

Aqui, demonstramos a interação entre o *ARF17* e *FBX5* através da rede de co-expressão, isso sugere que eles podem estar sendo regulados mutuamente, ou seja, mesmo que *ARF17* não fosse regulado positivamente, o desenvolvimento de raízes laterais seria ativado da mesma maneira, pois *FBX5* atua independente de *ARF17*.

Dessa forma, podemos concluir que a indução de *KIN12E* (miR6225-5p- reprimido) participa da expansão das células de raiz, contribuindo com a formação de raízes laterais, regulado pela indução de *ARF17* (*miR160*- reprimido) em conjunto com a repressão de *FBX5* (*miR167*- induzido) como resposta ao estresse por Al^{3+} (Figura 5).

Figura 5. Mecanismo de tolerância em cana-de-açúcar sob estresse por Al^{3+} .



FONTE: Autoria própria

6 CONCLUSÃO

Os miRNAs foram diferencialmente expressos nos dois genótipos de cana-de-açúcar (CTC-2 e RB855354), indicando a regulação de diferentes mecanismos de resposta sob o estresse por Al^{3+} . Além disso, conseguimos demonstrar no genótipo tolerante CTC-2, através da rede de co-expressão e análise do perfil de expressão de *miRNAs*, a regulação de dois possíveis mecanismos: a detoxificação de Al^{3+} mediada pelo *miR395* e o desenvolvimento de raízes laterais mediada pelo *miR160*, *miR6225-5p* e *miR167* na tolerância ao estresse por Al^{3+} . Em contrapartida, o genótipo sensível RB855354 parece ativar o sistema antioxidante através da repressão do *miR168*. Esses resultados fornecem informações importantes sobre a tolerância da cana-de-açúcar sob estresse por Al^{3+} , contribuindo para programas de melhoramento genético, que visam o desenvolvimento de novas cultivares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- AGRICULTURAL OUTLOOK 2019-2028. Disponível em:<https://doi.org/10.1787/agr_outlook-2019-en>. Acesso em: 24 de setembro de 2019.
- AKDOGAN, G.; TUFEKCI, E. D.; URANBEY, S. e UNVER, T. miRNA-based drought regulation in wheat. **Functional & Integrative Genomics**, Ankara, p. 221-233, 2016.
- ALARCÓN-POBLETE, E.; INOSTROZA-BLANCHETEAU, C.; ALBERDI, M.; RENGEL, Z.; REYES-DÍAZ, M. Molecular regulation of aluminum resistance and sulfur nutrition during root growth. **Planta**. v. 247, p. 27-39, 2018.
- BOTTINO, M. C.; ROSARIO, S.; GRATIVOL C.; THIEBAUT F.; ROJAS, C. A.; FARRINELI, L.; HEMERLY, A. S. e FERREIRA, P. C. G. High-Throughput sequencing of small RNA transcriptome reveals salt stress regulated MicroRNAs in Sugarcane. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n.3, 2013.
- BUDAK, H. e AKPINAR, B. A. Plant miRNAs: biogenesis, organization and origins. **Functional & Integrative Genomics**, Berlin, v.15, p. 523-531, 2015.
- CAPALDI, F. R.; GRATÃO, P. L.; REIS, A. R.; LIMA, L. W. e AZEVEDO, R. A. Sulfur Metabolism and Stress Defense Responses in Plants. **Tropical Plant Biology**. v. 8, p. 60-73, 2015.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: Cana-de-açúcar**, safra 2020/2021, primeiro levantamento, v.7, p. 1-62, 2020 Disponível em:<<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>>. Acesso em: 28 de junho de 2020.
- CUPERUS, J. T. FAHLGREN, N.; CARRINGTON, J. C. Evolution and Functional Diversification of MIRNA Genes. **The Plant Science**. v. 23, p. 431-442, 2011.
- DING, Y.; ZHOU, X.; ZUO, L.; WANG, H.; YU, D. Identification and functional characterization of the sulfate transporter gene GmSULTR1;2b in *soybean*. **BMC Genomics**. v. 17, 2016.
- DUBEY, S.; SAXENA, S.; CHAUHAN, A. S.; MATHUR, P.; RANI, V.; CHAKRABAROTY, D. Identification and expression analysis of conserved microRNAs during short and prolonged chromium stress in rice (*Oryza sativa*). **Environmental Science and Pollution Research**. v. 27, p. 380-390, 2020.
- FAGERIA, N.K. e NASCENTE, A.S. Management of soil acidity of South American soils for sustainable Crop Production. **In: Advances in Agronomy**. Cap.6, v.128, p. 221-275, 2014.
- FERREIRA, S. S.; HOTTA, C. T.; POELKING, V. G.; LEITE, D. C. C.; BUCKERIDGE, M. S.; LOUREIRO, M. E.; BARBOSA, M. H. P.; CARNEIRO, M. S. e SOUZA, G. M. Co-expression network analysis reveals transcription factors associated to cell wall biosynthesis in sugarcane. **Plant Molecular Biology**. v. 91, p. 15-35, 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2018. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 29 de junho de 2020.

GAO, J.; LUO, M.; PENG, H.; CHEN, F.; LI, W. Characterization of cadmium-responsive MicroRNAs and their target genes in maize (*Zea mays*) roots. **BMC Molecular Biology**. v. 20, n. 14, 2019.

GENTILE, A.; FERREIRA, T. H.; MATTOS, R. S.; DIAS, L. I.; HOSHINO, A. A.; CARNEIRO, M.S.; SOUZA, G.M., JR, T. C.; NOGUEIRA, R. M.; ENDRES, L. e MENOSSI, M. Effects of drought on the microtranscriptome of field-grown sugarcane plants. **Planta**. v.237, p.783-798, 2013.

GRAMZOW, L. e THEIBEN, G. Plant miRNA Conservation and Evolution *In: Molecular Biology*. Cap. 3, p. 41-50, 2019.

GUO, P.; QI, Y.; CAI, Y.Y.; YANG, T. Y.; YANG, L. T.; HUANG, Z. R. e CHEN, L. S. Aluminum effects on photosynthesis, reactive oxygen species and methylglyoxal detoxification in two Citrus species differing in aluminum tolerance. **Tree Physiology**, Oxford, v. 38, p.1548-1565, 2018.

GUO, P.; QI, Y.; YANG, L.; LAI, N.; YE, X.; YANG, Y. e CHEN, L. Root Adaptive Responses to Aluminum-Treatment Revealed by RNA-Seq in Two Citrus Species With Different Aluminum-Tolerance. **Frontiers in Plant Science**. v. 8, p. 1-18, 2017.

GUPTA, O. P.; SHARMA, P.; GUPTA, R. K. e SHARMA, I. MicroRNA mediated regulation of metal toxicity in plants: present status and future perspectives. **Plant Molecular Biology**, Berlin, v. 84, p. 1-18, 2014.

HE, H.; HE, L. e GU, M. Role of microRNAs in aluminum stress in plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 33, p. 831-836, 2014.

INOSTROZA-BLANCHETEAU, C.; REYES-DÍAZ, M.; AQUEA, F.; NUNES-NESI, A.; ALBERDI, M. e ARCE-JOHNSON, P. Biochemical and molecular changes in response to aluminium-stress in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 49, p.1005-1012, 2011.

IRANI, S.; TODD, C. D. Ureide metabolism under abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Plant Physiology**. v. 199, p. 87-95, 2016.

JAGADEESWARAN, G.; LI, Y-F.; SUNKAR, R. Redox signaling mediates the expression of a sulfate-deprivation-inducible microRNA395 in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**. v. 77, p. 85-96, 2014.

JEANDROZ, S. e LAMOTTE, O. Editorial: Plant Responses to Biotic and Abiotic Stresses: Lessons from Cell Signaling. **Frontiers in Plant Science**. v.8, p.1-3, 2017.

KOCHIAN, L. V.; PINEROS, M. A.; LIU, J. e MAGALHÃES, J. V. Plant Adaptation to Acid Soils: The Molecular Basis for Crop Aluminum Resistance. **Annual Review of Plant Biology**. v.66, p.571-598, 2015.

KOPITTKE, P. M.; MOORE, K. L.; LOMBI, E.; GIANONCELLI, A.; FERGUSON, B. J. F.; BLAMEY, P. C.; MENZIES, N. W.; NICHOLSON, T. M.; MCKENNA, B. A.; WANG, P.; GRESSHOFF, P. M.; KOUROUSIAS, G.; WEBB, R. I.; GREEN, K. e TOLLENAERE, A. Identification of the Primary Lesion of Toxic Aluminum in Plant Roots. **Plant Physiology**. v. 167, p. 1402-1411, 2015.

LAKSHMANAN, P. e ROBINSON, N. Stress Physiology: Abiotic Stresses *In: Sugarcane: Physiology, Biochemistry, and Functional Biology*, cap. 16, p. 411-434, 2013.

LI, J.; LAI, T.; SONG, H. e XU, X. MiR164 is Involved in Delaying Senescence of Strawberry (*Fragaria ananassa*) Fruit by Negatively Regulating NAC Transcription Factor Genes under Low Temperature. **Russian Journal of Plant Physiology**. v. 64, p. 251-259, 2017.

LI, K.; LIU, Z.; XING, L.; WEI, Y.; MAO, J.; MENG, Y.; BAO, L.; HAN, M.; ZHAO, C. e ZHANG, D. miRNAs associated with auxin signaling, stress response, and cellular activities mediate adventitious root formation in apple rootstocks. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 139, p. 66-81, 2019.

LI, L.; YI, H.; XUE, M.; YI, M. miR398 and miR395 are involved in response to SO₂ stress in *Arabidopsis thaliana*. **Ecotoxicology**. v. 26, p. 1181-1187, 2017.

LIANG, G. e YU, D. Reciprocal regulation among miR395, APS and SULTR2;1 in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Signaling & Behavior**. v. 5, p. 1257-1259, 2010.

LIU, J.; LI, Y.; WANG, W.; GAI, J.; LI, Y. Genome-wide analysis of MATE transporters and expression patterns of a subgroup of MATE genes in response to aluminum toxicity in soybean. **BMC Genomics**. v. 17, n. 223, 2016.

LIU, J.; MOORE, S.; CHEN, C.; e LINDSEY, K. Crosstalk Complexities between Auxin, Cytokinin, and Ethylene in *Arabidopsis* Root Development: From Experiments to Systems Modeling, and Back Again. **Molecular Plant**. v. 10, p. 1480-1496, 2017.

LUO, Y.; GUO, Z. e LI, L. Evolutionary conservation of microRNA regulatory programs in plant flower development. **Developmental Biology**. v. 380, p. 133-144, 2013.

MA, Q.; YI, R.; LI, L.; LIANG, Z.; ZENG, T.; ZHANG, Y.; HUANG, H.; ZHANG, X.; YIN, X.; CAI, Z.; MU, Y.; CHEN, Y.; ZENG, Q.; LI, X.; NIAN, H. GsMATE encoding a multidrug and toxic compound extrusion transporter enhances aluminum tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Plant Biology**. v.18, 2018.

MAIA, C.; ALMEIDA, C. F.; COSTA, P. M. A.; JÚNIOR, J. A. G. M.; SILVEIRA, G.; PETERNELLI, L. A.; BARBOSA, M. H. P. e BHERING, L. L. Phenotypic Plasticity of Sugarcane Genotypes under Aluminum Stress. **Journal of Experimental Agriculture International**, London, v. 22, n.3, p.1-11, 2018.

MANTOVANINI, L. J. Seleção de genótipos, análises fisiológicas e expressão de miRNAs em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) na resposta ao alumínio. 2017. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de ciências agrárias e veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2017.

- MARIN, E.; JOUANNET, V.; HERZ, A.; LOKERSE, A. S.; WEIJERS, D.; VAUCHERET, H.; NUSSAUME, L.; CRESPI, M.D. e MAIZELB, A. miR390, Arabidopsis TAS3 tasiRNAs, and Their AUXIN RESPONSE FACTOR Targets Define an Autoregulatory Network Quantitatively Regulating Lateral Root Growth. **The Plant Cell**. v.22, p.1104-1117, 2010.
- MITTALL, D.; SHARMA, N.; SHARMA, V.; SOPORY, S.K. e SANAN-MISHRA, N. Role of microRNAs in rice plant under salt stress. **Annals of Applied Biology**. v. 168, p.2-18, 2016.
- MÜLLER, S. e LIVANOS, P. Plant Kinesin-12: Localization Heterogeneity and Functional Implications. **International Journal Molecular Sciences**. v. 20, p. 1-12, 2019.
- NEBENFÜHR, A. e DIXIT, R. Kinesins and Myosins: Molecular Motors that Coordinate Cellular Functions in Plants. **Annual Review of Plant Biology**. v. 69, p. 329-361, 2018.
- NIBAU, C.; GIBBS, D. J.; BUNTING, K. A.; MOODY, L. A.; SMILES, E. J.; TUBBY, J. A.; BRADSHAW, S. J. e COATES, J. C. ARABIDILLO proteins have a novel and conserved domain structure important for the regulation of their stability. **Plant Molecular Biology**. v. 75, p. 77–92, 2011.
- NOGUEIROL, R. C.; MONTEIRO, F. A.; GRATÃO, P. L.; BORGIO, L. e AZEVEDO, R. A. Tropical soils with high aluminum concentrations cause oxidative stress in two tomato genotypes. **Environmental Monitoring Assessment**. v. 187, n.73, 2015.
- NOUNJAN, N.; CHANSONGKROW, P.; CHAROENSAWAN, V.; SIANGLIW4, J. L.; TOOJINDA, T.; CHADCHAWAN, S. e THEERAKULPISUT, P. High Performance of Photosynthesis and Osmotic Adjustment Are Associated With Salt Tolerance Ability in Rice Carrying Drought Tolerance QTL: Physiological and Co-expression Network Analysis. **Frontiers in Plant Science**. v. 9, p. 1-15, 2018.
- NOURIMAND, M.; TODD, C. D. Allantoin Increases Cadmium Tolerance in Arabidopsis via Activation of Antioxidant Mechanisms. **Plant & Cell Physiology**. v. 57, p. 2485-2496, 2016.
- REYES, J. L. e CHUA, N. H. ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. **The Plant Journal**. v. 49, n. 4, p. 592–606, 2007.
- ROWE, J. H.; TOPPING, J. F.; LIU, J. e LINDSEY, K. Abscisic acid regulates root growth under osmotic stress conditions via an interacting hormonal network with cytokinin, ethylene and auxin. **New Phytologist**. v. 211, p. 225-239, 2016.
- SILVA, R. G.; ROSA-SANTOS, T. M.; FRANÇA, S. C.; KOTTAPALLI, P.; KOTTAPALLI, K. R.; ZINGARETTI, S. M. Microtranscriptome analysis of sugarcane cultivars in response to aluminum stress. **Plos One**. v. 14, 2019.
- SIVAGURU, M.; LIU, J.; KOCHIAN, L. V. Targeted expression of SbMATE in the root distal transition zone is responsible for sorghum aluminum resistance. **The Plant Journal**. v. 76, n. 2, p. 297-307, 2013.

SHARMA, A.; SONG, J.; LIN, Q.; SINGH, R.; RAMOS, N.; WANG, K.; ZHANG, J.; MING, R. e YU, Q. Comparative Analysis of Homologous Sequences of *Saccharum officinarum* and *Saccharum spontaneum* Reveals Independent Polyploidization Events. **Frontiers in Plant Science**. v. 9, 2018.

STEPIEN, A.; KNOP, K.; DOLATA, J.; TAUBE, M.; BAJCZYK, M.; BARCISZEWSKA-PACAK, M.; PACAK, A.; JARMOLOWSKI, A. e SZWEYKOWSKA-KULINSKA, Z. Posttranscriptional coordination of splicing and miRNA biogenesis in plants. **Wires RNA**, v.8, n. 3 p. 1-28, 2017.

SUN, L.; TIAN, J.; ZHANG, H.; e LIAO, H. Phytohormone regulation of root growth triggered by P deficiency or Al toxicity. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 12 p. 3655–3664, 2016.

TAKAHASHI, H. Sulfate transport systems in plants: functional diversity and molecular mechanisms underlying regulatory coordination. **Journal of Experimental Botany**. v. 70, n. 16, p. 4075-4087, 2019.

TAN, M.; CHENG, D.; YANG, Y.; ZHANG, G.; QIN, M.; CHEN, J.; CHEN, Y. e JIANG, M. Co-expression network analysis of the transcriptomes of rice roots exposed to various cadmium stresses reveals universal cadmium-responsive genes. **BMC Plant Biology**. v. 17, p. 1-18, 2017.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **USDA Agricultural Projections to 2028**, 2019. Disponível em: <http://www.usda.gov/oce/commodity/projections/>. Acesso em: 23 de setembro de 2019.

VANSTRAELEN, M.; INZE, D.; e GEELEN, D. Mitosis-specific kinesins in Arabidopsis. **Trends in Plant Science**. v. 11, n. 4, 2006.

VARKONYI-GASIC, E. e HELLENS, R. P. Quantitative stem-loop RT-PCR for detection of microRNAs. *In: RNAi and Plant Gene Function Analysis*. v. 744, p. 145–157, 2011.

VERA-VILLALOBOS, H.; LUNARIO-DELGADO, L.; PÉREZ-RETAMAL, D.; ROMÁN, D.; LEIVA, J. C.; ZAMORANO, P.; MERCADO-SEGUEL, A.; GÁLVEZ, A. S.; BENITO, C.; WULF-ZOTTELE, C. Sulfate nutrition improves short-term Al³⁺-stress tolerance in roots of *Lolium perenne* L. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 148, p. 103-113, 2020.

VETTORE, A.L., SILVA, F.R., KEMPER, E.L., SOUZA, G.M., et al. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome Research**. v. 13, p. 2725-2735, 2003.

WANG, J.; MEI, J.; REN, G. Plant microRNAs: Biogenesis, Homeostasis, and Degradation. **Plant Cell Biology**. v.10, 2019.

WATT, D. Aluminum-responsive genes in sugarcane: identification and analysis of expression under oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**. v. 54, n. 385, p. 1163-1174, 2003.

WU, L.; YU, J.; SHEN, Q.; HUANG, L.; WU, D.; and ZHANG, G. Identification of microRNAs in response to aluminum stress in the roots of *Tibetan wild barley* and cultivated barley. **BMC Genomics**. v. 19, n. 560, 2018.

XIE, M.; ZHANG, S. and YU, B. microRNA biogenesis, degradation and activity in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 72, p. 87–99, 2015.

ZHANG, H.; CHEN, H.; HOU, Z.; XU, L. JIN, W. e LIANG, Z. Overexpression of Ath-MIR160b increased the biomass while reduced the content of tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots by targeting ARFs genes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 2020.

ZHANG, Q.; ZHAO, C.; LI, M.; SUN, W.; LIU, Y.; XIA, H.; SUN, M.; LI, A.; LI, C.; ZHAO, S.; HOU, L.; PICIMBON, J.; WANG, X. e ZHAO, Y. Genome-wide identification of *Thellungiella salsuginea* microRNAs with putative roles in the salt stress response. **BMC Plant Biology**. v. 13, p. 1-13, 2013.

ZHAO, X.; CHEN, Q.; WANG, Y.; SHEN, Z.; SHEN, W. e XU, X. Hydrogen-rich water induces aluminum tolerance in maize seedlings by enhancing antioxidant capacities and nutrient homeostasis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 144, p. 369-379, 2017.

ZHOU, D.; YANG, Y.; ZHANG, J.; JIANG, F.; CRAFT, E.; THANNHAUSER, T. W.; KOCHIAN, L.V. e LIU, J. Quantitative iTRAQ Proteomics Revealed Possible Roles for Antioxidant Proteins in Sorghum Aluminum Tolerance. **Plant Proteomics**. v. 7, 2017.

ZUURBIER, P. e VOOREN, J. V. Sugarcane Ethanol: Contributions to Climate Change Mitigation and the Environment. 2008.