

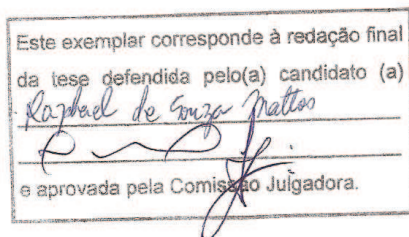
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Raphael de Souza Mattos

“Análise do microtranscritoma em variedades de cana-de-açúcar

(*Saccharum* spp.) submetidas a estresse hídrico.”



Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Vegetal e Melhoramento.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira

Co-orientadora: Andrea Akemi Hoshino

Campinas, 2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

M436a

Mattos, Raphael de Souza

Análise do microtranscriptoma em variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) submetidas a estresse hídrico / Raphael de Souza Mattos. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientadores: Marcelo Menossi Teixeira;
Andrea Akemi Hoshino.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. miRNA. 2. MicroRNAs. 3. Microarranjos de DNA. 4. Sequenciamento de DNA. 5. Seca. 6. Cana-de-açúcar. I. Teixeira, Marcelo Menossi, 1968-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título

Título em inglês: Microtranscriptome analysis of sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivars under drought stress.

Palavras-chave em inglês: miRNA; microRNA; DNA microarrays; DNA sequencing; Drought; Sugarcane.

Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Marcelo Menossi Teixeira, Fábio Papes, Marcelo Mendes Brandão.

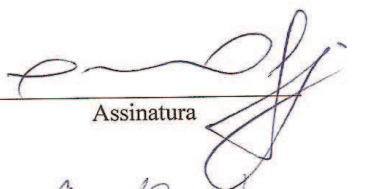
Data da defesa: 23/02/2011.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 23 de fevereiro de 2011

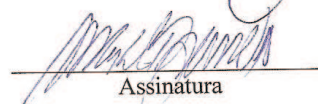
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira (Orientador)



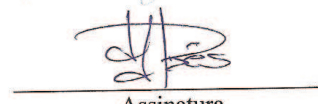
Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Mendes Brandão



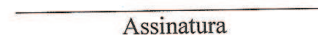
Assinatura

Prof. Dr. Fábio Papes



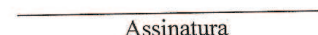
Assinatura

Prof. Dr. Felipe Rodrigues da Silva



Assinatura

Profª. Drª. Monalisa Sampaio Carneiro



Assinatura

Agradecimentos

Agradeço à minha família por toda a dedicação que me permitiu crescer ter condições de escolher uma profissão e usufruir das melhores coisas da vida.

Agradeço aos meus amigos que são uma família das mais unidas e me ajudaram incontáveis vezes durante os períodos mais difíceis da minha profissional e pessoal.

Minha namorada, Débora, que está ao meu lado neste momento ajudando até mesmo nas correções da tese, foi uma grande companheira nos últimos anos e me deu um apoio inestimável. Eu te amo.

Meus colegas do LGF, que me proporcionaram uma experiência de aprendizado técnico e de trabalho em grupo que me será sempre muito preciosa. Além de muitos momentos de descontração. Em destaque gostaria de agradecer Agustina, Kevin, Thaís e principalmente a Dra Andrea Hoshino, que me co-orientou e me carregou nos momentos em que o trabalho parecia ter sido em vão.

Professor Marcelo Menossi, que me deu a melhor oportunidade que eu poderia ter nesta fase de minha vida e me passou valores da vida acadêmica que vão ser sempre parte dos meus princípios como profissional.

Agradeço aos órgãos de fomento FAPESP, pela bolsa de estudos da qual usufruí durante o trabalho e CNPq, CAPES e FINEP pelo financiamento do laboratório.

“What I cannot create, I do not understand.”

Richard Feynman

Resumo

A cana-de-açúcar é uma das mais importantes espécies vegetais cultiváveis do mundo, sendo o Brasil o principal produtor. É uma fonte eficiente e de baixo custo para a obtenção de açúcar e etanol, que é considerado o mais promissor substituto do petróleo como fonte de energia a médio prazo, especialmente nos transportes. A seca é um dos principais estresses que reduzem a produtividade da cana e a produção de variedades tolerantes não só representa ganhos econômicos como contribui para a sustentabilidade dos canaviais. Embora a base genética da tolerância à seca ainda seja pouco conhecida, variedades desenvolvidas em programas de melhoramento tem apresentado progresso, apesar do ritmo ser mais lento que o desejado. Genômica funcional e desenvolvimento de marcadores colaboram aumentando a eficiência do melhoramento tradicional, mas ainda existem elementos do genoma que podem ser aproveitados de novas formas. Foram descobertos recentemente genes de função regulatória chamados microRNAs (miRNA) que também desempenham um papel na adaptação de plantas a diferentes estresses. Utilizando ESTs de cana-de-açúcar, sequenciamento de nova geração e microarranjos para avaliar a expressão de miRNAs sobre estresse hídrico foram descobertos novos miRNAs associados à seca e possíveis genes de miRNAs ligados à tolerância a este tipo de estresse.

Abstract

Sugarcane (*Saccharum* spp.) is amongst the most relevant crops in the world and Brazil is the most prominent producer. It is an inexpensive and efficient source for commodities such as sugar and ethanol, the latter being increasingly considered the most promising immediate energy source substitute for oil, mainly in transportation. Apart from being very productive, it is largely affected by stress-related yield losses, notably from abiotic triggers. Drought stress is determinant for every crop field, and this is true for sugarcane as well. Although the molecular basis drought stress tolerance lacks further elucidation, newly developed cultivars have successfully reduced yield loss due to water shortage, albeit not at the desirable pace. Functional genomics and molecular markers development assist new cultivar selection programs by identifying and locating agronomically relevant alleles and QTL's, but there are other elements in the genome which can provide new ways to approach crop field improvement. The recently discovered microRNAs (miRNA) are regulatory genes found to have an important role in plants adaptation under different kinds of stresses. By using sugarcane ESTs, deep-sequencing and microarray technology to access stress induced miRNA expression, we have found novel sugarcane miRNA participating in the drought stress response and identified possible tolerance related miRNA genes.

Sumário

I	Introdução	1
1	Revisão bibliográfica	2
1.1	Déficit hídrico	4
1.2	Perfil de expressão gênica	7
1.3	O microRNA	10
1.4	O microRNA em plantas	11
2	Objetivos	17
II	Microarranjos de miRNAs de folhas de cana-de-açúcar submetida à seca.	18
3	Material e métodos	19
3.1	Bioinformática	19
3.2	Material vegetal	20
3.3	Microrranjos de miRNAs	21
3.4	Validação por qPCR	23
4	Resultados e discussão	25
4.1	Confecção dos chips de microarranjo	25
4.2	Perfil de expressão de miRNAs em microrranjos	26

4.3	qPCR	35
III	Identificação de miRNAs de cana-de-açúcar sob seca usando sequenciamento de nova geração.	40
4.4	Introdução	41
IV	Discussão e conclusões gerais	69
4.5	Discussão	70
4.6	Conclusões	72
A	Análise fisiológica	85
B	Dados de variedades aparentadas	94
C	Resultados adicionais	98

Parte I

Introdução

Capítulo 1

Revisão bibliográfica

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma das mais importantes plantas cultiváveis do planeta, principalmente para os países das regiões tropical e subtropical. O Brasil é o maior produtor mundial, seguido pela Índia e pela Austrália. A produção da safra 2010/2011 está prevista em 624,9 milhões de toneladas, registrando uma produtividade média de 77,79 t/ha. Deste total, 46,2% destina-se à produção de açúcar e 53,8% à obtenção de álcool anidro ou hidratado (CONAB, 2011).

O cenário de uma futura crise energética derivada da escassez de combustíveis fósseis tornou-se mais nítido recentemente. O transporte é uma das maiores questões a serem tratadas neste cenário. Existem formas alternativas de obtenção de energia, mas obstáculos tecnológicos, econômicos e logísticos presentes em todos os casos tornam o etanol de cana-de-açúcar o mais promissor, a curto e médio prazo, por ser renovável e barato, graças ao balanço energético altamente positivo provido pela cana-de-açúcar (Lapola et al., 2010). Adicionalmente, existe a experiência brasileira da utilização de etanol como combustível veicular entre os anos 70 e 80, retomada na última década com grande sucesso.

Trabalhos recentes (Goldemberg et al., 2008; Sparovek et al., 2008) abordam discussões da

comunidade científica em relação a sustentabilidade da expansão da produção de cana-de-açúcar. Os estudos mostram que não há no momento práticas de desmatamento ligadas ao uso de novas terras para o plantio de cana-de-açúcar. No entanto, nota-se que a substituição de pastos por lavouras de cana-de-açúcar pode incentivar indiretamente o desmatamento de outras regiões. O plantio de cana-de-açúcar também já esteve associado a práticas agrícolas nocivas, como o descarte incorretos de subprodutos, uso excessivo de químicos e queimadas, que precisam ser controladas e eliminadas, como de fato tem sido feito. Portanto, é possível que a produção possa aumentar de maneira sustentável, mas isto também depende de questões como a eficiência da cadeia produtiva na região Nordeste.

Embora nas últimas décadas o uso de variedades selecionadas e melhoradas tenha conseguido aumentar a produtividade no Nordeste, os produtores dessa região sofrem com o baixo rendimento de seus canaviais. Sua produtividade média foi de 57159 kg/ha em 2009, o menor valor em todo o Brasil, enquanto no sudeste o valor foi de 82030 kg/ha (CONAB, 2011). O último levantamento da safra revelou que houve queda considerável em produtividade (4,6%), embora o rendimento tenha aumentado timidamente, a 3,4%. O aumento, entretanto, se deve ao crescimento da área de plantio, especialmente nas regiões Centro-Oeste e Norte, tendência que pode gerar problemas ambientais e aumento de pragas. Os dados de produção tornam-se mais significativos se forem comparados com o crescimento de mais de 15% da safra 2008/2009 e de 7% em 2009/2010.

A região Nordeste apresenta-se como coadjuvante no levantamento apresentado pela CONAB (2011), colhendo aproximadamente 35% mais que a região Sul, mas contando com o dobro da área plantada para isso. A produtividade média no Nordeste é a pior do país. Entre as principais causas dessa disparidade estão fontes de estresse abiótico, como períodos prolongados de seca e salinidade do solo, e fatores como a floração da cana-de-açúcar em certas latitudes, pragas e uso de variedades inadequadas (Goldemberg et al., 2008; Sparovek et al., 2008). Todos estes problemas podem ser amenizados com o desenvolvimento de cultivares melhor adaptados ao cenário da região. Para que tal medida seja não apenas possível, mas também bem-sucedida, são necessários muitos estudos

que caracterizem a biologia da planta diante destes desafios.

A disponibilidade de água doce diminuiu mais de seis vezes entre 1900 e 1995, mais do que o dobro da razão de crescimento populacional, sendo a agricultura responsável por 70% do uso de água, principalmente por conta da irrigação (Kates and Parris, 2003). Esse cenário aponta para uma necessidade de se aumentar a eficiência na produção agrícola quanto ao uso da água. A seca é um dos principais estresses abióticos que atingem a cultura da cana-de-açúcar e, dada a escassez de água doce prevista para o futuro em muitas áreas, o sustento da indústria canavieira no Brasil e no mundo dependerá do desenvolvimento de variedades de cana-de-açúcar tolerantes ao estresse hídrico.

Membros da RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento Sucro-alcooleiro) vem desde 2004 conduzindo experimentos sob condições de campo e de casa-de-vegetação para estudar os mecanismos de tolerância à seca em cana-de-açúcar. Dessa forma, já foram estabelecidas e ajustadas algumas metodologias básicas para as análises agronômicas, fisiológicas e bioquímicas da cultura, além da quantificação instrumental das taxas fotossintéticas e das trocas gasosas instantâneas, potencial hídrico foliar, teores e fluorescência das clorofilas e da discriminação dos isótopos estáveis de carbono. Até o presente momento, os resultados obtidos pela RIDESA mostram que a cana-de-açúcar possui vários mecanismos de tolerância à seca, com destaque para o controle estomático, enrolamento foliar e o tamanho e distribuição do sistema radicular. Cada variedade responde de forma diferenciada ao estresse hídrico. Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos por outros pesquisadores em estudos da fisiologia de cana-de-açúcar (Inman-Bamber and Smith, 2005; Inman-Bamber et al., 2009).

1.1 Déficit hídrico

A escassez de água ocorre quando por alguma razão a absorção de água pela planta é inferior ao seu consumo. Em qualquer fase do desenvolvimento essa condição pode afetar o organismo de

maneira intensa, limitando seu crescimento e promovendo respostas fisiológicas imediatas detectadas em alterações grande parte dos parâmetros fisiológicos. A persistência da condição de estresse leva a intensificação da resposta, tendo em vista a sobrevivência em detrimento de eficiência e produtividade. Esse quadro faz parte dos processos de tolerância ou resistência que cada espécie desenvolveu no curso da sua história evolutiva (Hsiao, 1973; Morgan, 1984; Bray, 1997).

As plantas apresentam diferentes mecanismos de tolerância e resistência, parte de uma intrincada rede regulatória ainda pouco compreendida que geralmente também envolve respostas a outros tipos de estresses (Bray, 1997; Chaves et al., 2003). Não é surpreendente, por exemplo, encontrar alguns genes diferencialmente expressos tanto em tratamentos de seca quanto de frio, salinidade e até mesmo calor (Chaves et al., 2003). Alguns dos mecanismos mais importantes para a resposta a seca são o fechamento estomático, regulação da fotossíntese, inibição de crescimento, ajustes osmóticos na raiz, senescência de folhas e mobilização de reservas. Todos esses processos são regulados por vias de transdução dependentes e não dependentes de ABA, hormônio este fortemente ligado à resposta a seca. Estas vias envolvem genes invariavelmente induzidos por diferentes tipos de estresse, como fatores de transcrição das famílias DREB, ABRE e MYB (Morgan, 1984; Bray, 1997; Zhu, 2002; Chaves et al., 2003; Nevo and Chen, 2010).

A resposta da cana-de-açúcar submetida a vários estresses abióticos foi estudada sob diferentes abordagens em trabalhos recentes. A cana-de-açúcar que passa por um período de déficit hídrico tem maiores possibilidades de realizar seu potencial de armazenamento de hidrocarbonetos. Inman-Bamber and Smith (2005) exploraram os efeitos da absorção de água e períodos de estresse na acumulação de açúcar, mostrando como é possível produzir condições ótimas para aumentar a produtividade da cana. Mas, como qualquer outra planta, a cana-de-açúcar perde vigor perante a seca, especialmente nas primeiras fases de desenvolvimento, o que limita seu rendimento final. A resposta a estresses abióticos, incluindo a seca, na cana-de-açúcar tem sido objeto de estudo de muitos grupos no Brasil, em razão dos problemas de produtividade que são provocados pelo estresse (Papini-Terzi et al., 2005; Rocha et al., 2007; Felix et al., 2009). Embora existam

informações úteis em relação a outras gramíneas, elas são incompletas e muito recentes (Nevo and Chen, 2010). São necessários novos estudos para elucidar as características fisiológicas e genéticas do déficit hídrico em cana.

Nos últimos 3 anos foi desenvolvido um grande projeto visando a caracterizar a cana-de-açúcar sob seca estudando sua fisiologia, transcritômica e metabolômica. Uma dessas vertentes originou um estudo fisiológico desenvolvido por Endres et al. (dados não publicados) na Universidade Federal de Alagoas (UFAL), uma das universidades integrantes da RIDEA. O trabalho comparou os parâmetros fisiológicos de seis variedades de cana-de-açúcar cultivadas em experimentos de campo, sob condições controle (irrigação) e de seca, durante 1 ano. Estas informações são colaborações do grupo de pesquisa da UFAL e encontram-se organizadas e discutidas no Anexo A. Os resultados apontaram diferenças acentuadas em parâmetros que direta ou indiretamente refletem a condições de déficit hídrico em plantas, segundo estudos anteriores (Hsiao, 1973; Bray, 1997; Inman-Bamber and Smith, 2005). De forma geral, a produtividade das variedades (Figura 1.1) resume muito bem o que foi observado em outras medições nesse estudo.

Os dados denotam a diferença significativa de produtividade nos dois tratamentos, para todas as variedades. As variedades RB92579 e RB867515 apresentam os melhores desempenhos, enquanto RB72454 a maior diferença entre tratamentos e os piores resultados sob estresse, juntamente com RB855536. A relação mais interessante, no entanto, é de RB867515 e RB855536, que são decendentes de cruzamentos diferentes em que um dos parentais era RB72454 (Anexo B). Dadas a disparidade no desempenho diante da seca e o parentesco de RB867515 e RB855536, as duas variedades mostraram-se ótimas candidatas a objetos de estudo dos experimentos de biologia molecular.

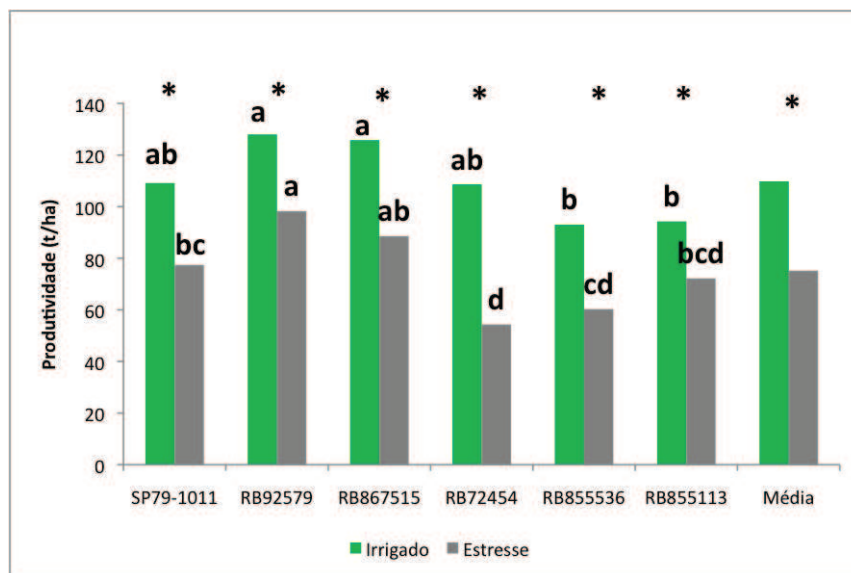


Figura 1.1: Produtividade em t/ha das seis variedades em condições controle (irrigado) e tratamento (sequeiro). Os asteriscos indicam diferenças significativas entre os dois tratamentos e as letras sobre as barras agrupam variedades que não diferem significativamente em cada tratamento. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes ($P < 0,05$ no teste de Tukey). (Endres et al., dados não publicados)

1.2 Perfil de expressão gênica

Apesar de possuir um dos mais complexos genomas dentre as espécies vegetais cultivadas (híbridos interespecíficos poliplóides com elevado número de cromossomos e aneuploidia (D'hont et al., 1996)), a cana-de-açúcar tem sido objeto de mapeamentos genéticos bem-sucedidos empregando diversos tipos de marcadores moleculares (Cordeiro et al., 2001; Ming et al., 2002a). O desenvolvimento de mapas genéticos permitiu a identificação de *Quantitative Traits Loci* (QTL) associados ao teor de açúcar (Ming et al., 2002b, c). Entretanto os QTLs identificados tem se mostrado suficientes para explicar apenas cerca de 15% da variação observada para as características quantitativas. Isso possivelmente reflete um controle poligênico complexo e a redundância genética existentes na cana-de-açúcar, onde qualquer *locus* gênico e seu complemento alélico pode estar representado várias vezes em cromossomos homólogos de cada um dos genomas presentes em cada

indivíduo (Casu et al., 2005). O mapeamento comparativo entre cana-de-açúcar e outras gramíneas C4, como a diplóide *Sorghum bicolor*, demonstrou sintonia elevada entre os genomas, indicando sua conservação e sugerindo seu uso como referência para estudo em cana-de-açúcar (Asnaghi et al., 2000).

Na última década, foram desenvolvidos alguns trabalhos com a obtenção de coleções de *Expressed Sequence Tags* (EST) (Carson and Botha, 2000; Carson et al., 2002). O estudo mais abrangente em relação ao transcrito da cana-de-açúcar foi conduzido pelo Projeto SUCEST/FAPESP (Vettore et al., 2001), resultando em 26 bibliotecas de cDNAs derivadas de 12 genótipos cultivados em diferentes condições. Atualmente, um total de 255.635 ESTs de cana-de-açúcar estão disponíveis em bancos de dados públicos, constituindo um recurso básico para estudos desta espécie. Este conjunto de dados transcricionais foi analisado sob diversos enfoques (Arruda, 2001; Grivet et al., 2003). Estudos complementares fundamentaram-se na coleção de ESTs de cana-de-açúcar (SUCEST) para a identificação de genes envolvidos na resposta a baixa temperatura por meio de macroarranjos de DNA (Nogueira et al., 2003), na caracterização dos perfis de expressão em diferentes tecidos (Papini-Terzi et al., 2005), na avaliação da expressão diferencial das vias de transdução de sinais frente a diferentes estresses bióticos e abióticos (Rocha et al., 2007), na caracterização de fatores de transcrição bZIPs (Schlögl et al., 2008), no estudo dos efeitos de altos níveis de CO₂ (De Souza et al., 2008) e nos elementos de transdução de sinal envolvidos na acumulação de açúcar (Felix et al., 2009). Um dos tratamentos aplicados por Rocha et al. (2007) foi suspensão de rega, por 24, 72 e 120 horas com o qual foram obtidos dados em casa de vegetação para uma variedade de cana-de-açúcar suscetível à seca. Dentre todos os tratamentos avaliados por Rocha et al., a seca foi o que causou maiores alterações no transcrito da cana.

Outros estudos viabilizados por coleções de ESTs, análises *in silico* e microarranjos permitiram a identificação de genes preferencialmente expressos associados ao acúmulo de sacarose (Carson et al., 2002; Casu et al., 2003, 2004) comparando os perfis transcricionais de amostras de colmo maduras e imaturas. Os genes relacionados ao metabolismo de sacarose e carboidratos não

apresentam expressão significativamente associada às amostras de colmo maduro. Já os transcritos relacionados à biossíntese de fibras (lignificação e suberização), transporte de açúcares e tolerância à estresses abióticos mostraram maior acúmulo associado à maturação. Papini-Terzi et al. (2009) compararam a expressão de genes de cana-de-açúcar entre duas variedades contrastantes na capacidade de acúmulo de açúcar, utilizando microarranjos. A análise de amostras obtidas de plantas expostas ao déficit hídrico revelou que esta situação tem mais genes diferencialmente expressos em relação a outros tratamentos utilizados, e que boa parte deles também está associada ao maior acúmulo de açúcar, visto que a escassez de água é importante para certas fases da maturação.

As variedades de cana-de-açúcar utilizadas hoje são fruto de programas de melhoramento, que selecionam indivíduos com níveis de expressão alterados para genes de interesse, tanto como consequência de variações alélicas nos promotores como por diferenças na atividade ou nível de expressão dos fatores de transcrição correspondentes. Portanto, a obtenção de dados de expressão é importante para o estabelecimento das funções gênicas, assim como para associar dados de sequência de um genoma a características de interesse agrônomo. Assim, seria possível produzir plantas transgênicas nas quais os genes de interesse têm sua expressão alterada, e desenvolver marcadores moleculares que auxiliem o processo tradicional de melhoramento genético.

Trabalhos recentes (Bartel, 2004) indicam que muitos miRNAs, comumente tendo como alvos fatores de transcrição, foram importantes para a evolução e expansão das espécies vegetais, mantendo-se altamente conservados. Ao mesmo tempo, a maioria dos miRNAs associados a metabolismo, transdução de sinal, modificação de proteínas e ligação a carboidratos ou RNA são pouco conservados (Willmann and Poethig, 2007). Esses dados sugerem que os miRNAs podem ser importantes para muitos processos celulares além do desenvolvimento. No entanto, ainda não existem dados de expressão gênica dos miRNAs da cana-de-açúcar sob tais condições, o que os torna ótimos candidatos a mediadores da resposta metabólica a estresses, implicando a necessidade de estudar a participação desta classe de RNA no mecanismo de resistência à seca.

1.3 O microRNA

Com o início dos projetos genoma ficou evidenciado que organismos complexos apresentam um número de genes codificantes de proteínas menor que o esperado (Mattick, 2001). *Pseudomonas aeruginosa* possui cerca de 5.500 genes, *Saccharomyces cerevisiae* possui aproximadamente 6.200, *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans*, que são organismos mais complexos que os dois primeiros, possuem apenas o dobro de genes (12.000 e 14.000 respectivamente) e humanos possuem em seu genoma cerca de 30.000 genes (Rubin et al., 2000; Stover et al., 2000; Venter et al., 2001). O *splicing* alternativo pode contribuir para o aumento do repertório de isoformas de proteínas, mas existem muitas evidências de que o principal motivo da evolução das espécies é o aumento da quantidade de RNAs não codificantes que conduzem a regulação da expressão gênica e assim controlam a arquitetura do sistema (Mattick, 2001).

O dogma central da genética que postula a função do RNA como um carregador de informação intermediário tem sido questionado há muito tempo. No final da década de 60, Britten and Davidson (1969) propuseram possíveis funções na regulação gênica desempenhada pelos RNAs, nas quais RNAs “ativadores”, transcritos de regiões genômicas redundantes, poderiam formar complexos com sequências regulatórias no DNA e ativar uma grande quantidade de genes. Em 1990, dois estudos com *Petunia hybrida* evidenciaram a existência de algum mecanismo para suprimir a expressão de transgenes assim como a expressão do gene endógeno, denominado assim de co-supressão (Napoli et al., 1990; der Krol et al., 1990). Guo and Kemphues (1995) iniciaram os estudos com células de animais com o intuito de desvendar as bases moleculares do silenciamento, mas foram Fire e colegas 1998 que descobriram como a formação de RNA de dupla fita induz silenciamento gênico, trabalho pelo qual foram agraciados com o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina de 2006. Até então, acreditava-se que apenas RNA exógeno (transgene ou viral) poderia provocar silenciamento quando inserido na célula.

O primeiro artigo demonstrando o silenciamento de um gene por interferência de um RNA

endógeno foi publicado por Lee et al. (1993). No estudo, realizado em *Caenorhabditis elegans*, foi constatado que uma mutação em lin-4 causava um aumento na tradução do RNA de outro gene específico, lin-14. Ao clonar lin-4 e administrá-lo a mutantes *Caenorhabditis* de quatro espécies, o fenótipo selvagem foi recuperado. Foi verificado que lin-4 não codificava uma proteína, e o sequenciamento dos dois genes revelou um sítio complementar a lin-4 na região 3' UTR de lin-14. Em 2000, utilizando o mesmo modelo animal, outro grupo identificou o gene let-7 como um transcrito de 21 nucleotídeos que regula aspectos temporais do desenvolvimento do nemátodo (Reinhart et al., 2000).

Com a evolução das técnicas de clonagem, sequenciamento de genomas e das análises de bioinformática, centenas de sequências pequenas de RNAs com potencial papel na regulação gênica foram encontrados em genomas de animais (vertebrados e invertebrados) e denominados *microRNAs* (Lagos-Quintana et al., 2001; Lee and Ambros, 2001). Os microRNAs (miRNAs) são definidos como sequências endógenas de 20 a 25 nucleotídeos derivadas de estruturas em forma de grampo de cabelo (*hairpin*), formadas pelo dobramento de uma fita simples de RNA obtida por transcrição. O miRNA maduro é complementar a um trecho do RNA mensageiro alvo (mRNA) de um ou mais genes, e a ligação das duas fitas — miRNA e mRNA — é mediada por um complexo protéico, que promove o silenciamento do alvo por clivagem ou bloqueio da tradução (Bartel, 2004).

1.4 O microRNA em plantas

A biogênese de miRNAs em *Arabidopsis thaliana*, revisada por Chen (2005), é similar à encontrada em animais, onde os miRNAs são processados a partir de precursores primários que apresentam a estrutura característica de *hairpin*, e ocorre em pelo menos duas etapas mediadas por enzimas semelhantes a RNase III (Drosha e Dicer-like) no núcleo e no citoplasma. Em seguida o miRNA é incorporado a um complexo enzimático denominado RISC (do inglês, RNA-Induced Silencing Complex), que irá promover o silenciamento de um gene alvo específico (Kim et al., 2005).

No entanto, o processamento dos precursores de miRNA em plantas ocorrem principalmente no núcleo (Figura 1.2) (Papp et al., 2003), e apresenta uma etapa adicional de metilação da ribose do último nucleotídeo pela miRNA metiltransferase HEN1, protegendo-o de reações enzimáticas da polimerase ou transferase terminal, que adicionam nucleotídeos, principalmente uracilas, na extremidade 3' do miRNA (Li et al., 2005). Além disso, miRNAs de plantas provocam o silenciamento gênico preferencialmente pela clivagem do RNA, enquanto que, em animais, o mecanismo utilizado é a supressão da tradução (Llave et al., 2002; Rhoades et al., 2002; Jones-Rhoades, 2004; Sunkar and Zhu, 2004).

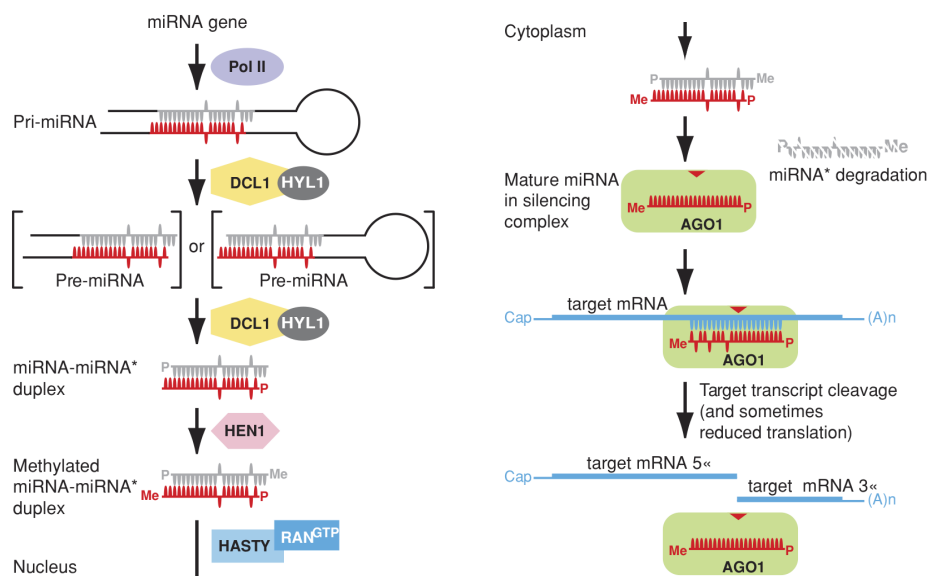


Figura 1.2: Via de processamento de miRNAs em plantas. O precursor primário do miRNA (pri-miRNA) é transcrito pela RNA polimerase II. A estrutura secundária deste transcrito é reconhecida por DCL-1 e a acopladora de RNA HYL1. A DCL1 então cliva o transcrito 2 vezes, produzindo o pré-miRNA e em seguida o complexo miRNA-miRNA*. Após a metilação por HEN1, o transporte para o citoplasma é mediado por HASTY. O duplex é dissociado e a fita mais estável (miRNA maduro) se liga a AGO1, do complexo RISC, que reconhece e cliva o mRNA alvo. Adaptado de Jones-Rhoades et al. (2006).

Muitos miRNAs de plantas, assim como seus genes alvo e possíveis funções, foram identificados (Emery et al., 2003; Tang et al., 2003; Chen, 2004; Juarez et al., 2004). Entretanto, as técnicas de clonagem utilizadas aparentemente excluíram aqueles miRNAs não expressos ou es-

pecíficos de determinados tecidos ou estágios de desenvolvimento, o que motivou a preferência por uma abordagem computacional, resultando em um número expressivo de miRNAs identificados em *A. thaliana* (Bonnet et al., 2004; Adai et al., 2005). Essa abordagem é bem sucedida para identificação de miRNAs em genomas completos e também por homologia daqueles conservados entre diferentes espécies, suportado pelo fato de que, diferentemente dos miRNAs de mamíferos, em plantas existe um alto nível de complementaridade entre as sequências alvo e dos miRNAs, permitindo a predição através da bioinformática (Jones-Rhoades, 2004). Essa estratégia permitiu a identificação de miRNAs envolvidos na sinalização da auxina, manutenção da polaridade de órgãos, determinação da identidade de órgãos florais e o correto desenvolvimento reprodutivo e crescimento foliar (Reinhart et al., 2002; Aukerman and Sakai, 2003; Palatnik et al., 2003; Chen, 2004; Mallory et al., 2005; Jones-Rhoades et al., 2006).

Vários grupos de pesquisa identificaram miRNAs que controlam a expressão de fatores de transcrição responsáveis pela regulação do desenvolvimento em plantas (Llave et al., 2002; Rhoades et al., 2002; Palatnik et al., 2003). Há indícios de que as sequências alvo de dois miRNAs descobertos em *A. thaliana* são conservadas em todas as linhagens de plantas terrestres. Isto indica que a regulação negativa da expressão através de miRNAs evoluiu há pelo menos 400 milhões de anos e pode ter desempenhado um papel na evolução da flora (Lee et al., 2004; Arazi et al., 2005; Axtell and Bartel, 2005; Chen et al., 2005). Recentemente um estudo demonstrou que a alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* possui regulação pós-transcricional mediada por miRNAs, mostrando que esse mecanismo existia antes da multicelularidade (Molnar et al., 2007). Entretanto, muitos novos miRNAs não conservados entre as espécies estão sendo identificados e a diversidade de genes alvo envolve, entre outros processos, vias metabólicas e atividades celulares relacionados com o desenvolvimento e resistência a estresses abióticos (Llave et al., 2002; Eckardt, 2004; Sunkar and Zhu, 2004).

Utilizando *Populus trichocarpa* como modelo, Lu et al. (2005) avaliaram que muitos miRNAs possuíam como alvos preditos genes relacionados com controle do desenvolvimento e/ou estresse

e com possíveis funções associadas a biossíntese de metabólitos de parede celular importantes na regulação do desenvolvimento da madeira em árvores. Além disso, apesar de algumas sequências serem conservadas em *Arabidopsis*, esses miRNAs exibiram padrões de expressão específicos da espécie durante o desenvolvimento, sugerindo que mesmo miRNAs conservados podem apresentar papéis regulatórios diferentes e determinantes em cada espécie.

Em milho foi demonstrada a importância dos miRNAs165/166 na especificação da polaridade das folhas devido ao controle que exercem nos genes *rolled leaf1* e *PHABULOSA* (PHB) (Juarez et al., 2004; Mallory et al., 2004), e que a repressão do gene *gl15* exercida pelo miRNA172 promove a transição da porção vegetativa da planta da fase juvenil para a fase adulta (Lauter et al., 2005). Mas a maior parte dos miRNAs de milho foram identificados utilizando ferramentas de bioinformática. Zhang et al. (2006) identificaram 188 miRNAs analisando bancos de dados de sequências ESTs públicos e obtiveram candidatos a genes alvo para 115 deles. Essa análise demonstrou a provável importância da regulação de miRNAs em processos como desenvolvimento embrionário e floral, transdução de sinal hormonal, síntese de sacarose e celulose, vias de degradação de ubiquitina, transporte de proteínas e estresses ambientais, além de vias da própria biossíntese de miRNAs, já que um dos alvos preditos era a proteína ARGONAUTE, que tem um papel fundamental no complexo de silenciamento gênico RISC.

Sunkar and Zhu (2004) identificaram 26 novas sequências de miRNAs em exemplares de *Arabidopsis* expostas a desidratação, salinidade, frio ou ao ácido abscísico que não eram conservados em arroz (*Oryza sativa*) sugerindo a existência de outros miRNAs não conservados que podem ser críticos para a regulação de processos associados a condições específicas e modulação de respostas peculiares de cada espécie. Em *Arabidopsis*, três miRNAs foram induzidos por seca, um deles, miR393, induzido também por frio e ABA, tem como prováveis alvos genes do sistema de ubiquitinação de proteínas. Já o miR397b tem como alvo laccases e proteínas com função ainda desconhecidas. O miR402 tem como alvo uma DNA glicosilase, envolvida em desmetilação de DNA. Em arroz foram identificados cinco microRNAs que são induzidos por déficit hídrico,

mas somente um deles, miR169, teve sua expressão confirmada por *Northern blot* (Zhao et al., 2007). O miR169 tem como alvo fatores de transcrição que se ligam à sequência CCAAT, e que são ubíquos no reino vegetal, embora suas funções ainda sejam pouco conhecidas. Assim, este é um campo pouco explorado e de grande interesse científico e tecnológico.

Dentro deste contexto, durante o desenvolvimento do projeto EST da cana-de-açúcar (SU-CEST) foram gerados 43.141 prováveis transcritos de cana-de-açúcar (SASs, *SUCEST Assembled Sequences*), dos quais mais de 25% não apresentam nenhuma homologia com sequências gênicas ou protéicas previamente identificadas em qualquer outro organismo (Vettore et al., 2003). Muitas dessas sequências, específicas de cana-de-açúcar, podem estar envolvidas na regulação pós transcricional de outros genes.

É provável que existam mais miRNAs ainda não identificados. Uma estimativa importante é que 1% dos genes codificadores de proteínas possuam um miRNA relacionado com sua regulação (Bartel, 2004). À luz destes dados, a cana-de-açúcar pode possuir cerca de 430 miRNAs. Atualmente, o banco de dados público miRBase (Griffiths-Jones et al., 2008) tem apenas 16 sequências de miRNAs de cana-de-açúcar, preditas por bioinformática através de buscas em banco de dados públicos. Embora ainda não apareçam entre as sequências públicas, novos miRNAs foram identificados *in silico* mediante a análise dos EST de cana-de-açúcar (Zanca et al., 2010), mas a pequena quantidade de sequências novas aumenta a noção de que são necessárias novos recursos para o estudo genético da cana-de-açúcar.

Os métodos para identificação de miRNA evoluíram nos últimos anos. Estudos (Adai et al., 2005; Parisien and Major, 2008; Fiers et al., 2009; Jones-Rhoades, 2010) demonstram como características físicas e químicas específicas dos miRNAs e seus precursores podem ser parâmetros confiáveis para uma predição mais eficiente e confiável dos mesmos. A aplicação desses conceitos é especialmente promissora para organismos como a cana-de-açúcar, para a qual não existe a mesma quantidade de informações disponíveis em organismos modelo.

O estudo da expressão de miRNA também foi imensamente facilitado pelo desenvolvimento de novas tecnologias. A técnica de *microarray* é uma ferramenta importante em genômica funcional e tem sido utilizada também na identificação de microRNAs diferencialmente expressos em diversos tratamentos e estágios de desenvolvimento das plantas (Axtell and Bartel, 2005). Mais recentemente, com a crescente acessibilidade de novas tecnologias de sequenciamento em larga escala, tem sido comum a descoberta e a análise de expressão espacial e temporal de miRNAs em plantas e outros organismos (Friedländer et al., 2008; Nobuta et al., 2009; Liang et al., 2010; Zhao et al., 2010).

Estudar a influência dos miRNAs em processos agronomicamente importantes é uma necessidade e uma ótima oportunidade de produzir grandes avanços científicos e tecnológicos. A cana-de-açúcar passa pelo seu momento de maior destaque na comunidade científica e a disponibilidade de ferramentas de estudo em genética e biologia molecular é sem precedentes. Suas características genéticas únicas e imensa capacidade de produção de energia estão entre as mais excitantes questões a serem exploradas atualmente em genética vegetal.

Capítulo 2

Objetivos

O objetivo deste projeto foi investigar o microtranscritoma associado à resposta ao déficit hídrico em cana-de-açúcar em busca de miRNAs associados a resposta a seca. O estudo também procurou identificar novos microRNAs de cana-de-açúcar. Este trabalho faz parte de uma iniciativa maior, com abordagens fisiológicas, moleculares e bioquímicas, desenvolvidas pela rede RIDESA-USP-UNICAMP, cujo objetivo é não só compreender as respostas de plantas de cana-de-açúcar frente ao déficit hídrico como também identificar quais vias metabólicas são mais eficientes nesse contexto.

Parte II

**Microarranjos de miRNAs de folhas de
cana-de-açúcar submetida à seca.**

Capítulo 3

Material e métodos

3.1 Bioinformática

Procedimentos e ferramentas de bioinformática desenvolvidas no laboratório foram utilizados na maioria das etapas do trabalho, juntamente com recursos disponibilizados por outros pesquisadores e instituições.

As versões 2.2.20 (primeiras análises) e 2.2.24+ do pacote BLAST (Altschul et al., 1990) foram instaladas e utilizadas para buscar sequências similares entre os ESTs de cana-de-açúcar e miRNAs de plantas disponíveis no miRBase (Griffiths-Jones et al., 2008), entre miRNAs candidatos e alvos presentes no SUCEST e no SoGI (*Saccharum officinarum Gene Index*) e entre alvos candidatos e proteínas conhecidas no Genbank (Benson et al., 2004). Os algoritmos blastn-short, blastn e blastx foram usados com parâmetros padrão, exceto quando descrito de outra forma. O servidor de banco de dados de código aberto MySQL foi empregado para armazenamento e manipulação de dados e a biblioteca de funções da linguagem de programação Python para bioinformática, Biopython (Cock et al., 2009), foi utilizada para desenvolver ferramentas de software necessárias.

3.2 Material vegetal

As amostras de folha de cana-de-açúcar foram obtidas de experimentos de campo realizados pela equipe do Prof. Laurício Endres, Universidade Federal de Alagoas (UFAL), na localidade de Rio Largo (AL), empregando seis variedades de cana-de-açúcar com diferentes padrões de resposta a seca. São elas RB92579, RB867515, SP79-1011, RB72454, RB855536 e RB855113. As plantas foram mantidas em regime de irrigação e ausência de irrigação durante 12 meses.

Aos 3, 7 e 11 meses após o plantio foram realizadas coletas de dados fisiológicos e amostras biológicas. Para o presente trabalho, folhas +1 (folha mais jovem com lígula exposta) obtidas de representantes aleatórias de cada uma das variedades variedades foram armazenadas a -70°C . As amostras foram maceradas com cadinho e pistilo, sempre resfriada com nitrogênio líquido. A extração de RNA total foi realizada com o kit de extração miRvana (Lifetech), segundo o protocolo fornecido pelo fabricante, excetuando-se a temperatura de centrifugação, fixada em 15°C , em vez da temperatura ambiente.

Medições necessárias para a análise fisiológica das plantas foram feitas pela equipe responsável nos períodos de coleta. Os parâmetros mais simples considerados foram altura da planta, largura e comprimento das folhas, número de folhas verdes, número de folhas expandidas, área foliar (AF), índice de área foliar (IAF ou LAI) e número de plantas na linha central da parcela (NPLC). O índice de área foliar foi avaliado por dois métodos: medidas mensais, com a utilização do aparelho *Plant Canopy Analyzer*, modelo LAI-2000 (LI-COR, EUA), e o método calculado, realizado através da obtenção de medidas diretas, sendo obtido em função das medidas de crescimento (comprimento e largura da folha +3, número de folhas verdes e do número de plantas na linha central) pela área de terreno. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Também foram avaliados potencial hídrico (ψ_{wf}) e osmótico foliar (ψ_{os}) na folha +1 pela manhã (5-6 h) e ao meio-dia, com o auxílio de uma bomba de pressão (câmara de pressão de

Scholander) e osmômetro de pressão de vapor. O IRGA (ADC Bioscientific, ING) foi utilizado para obter as taxas de fotossíntese (A), condutância estomática (gs), transpiração (E) e concentração interna de CO₂ (Ci). O fluorômetro foi utilizado para obter a eficiência quântica potencial (Fv/Fm), quantificado na antemanhã e às 13 h, e efetiva (ϕ PSII), quantificado às 10 h, com medições padronizadas também na folha +1.

3.3 Microrranjos de miRNAs

A análise de expressão em microarranjo foi possibilitada pelo serviço da empresa LC Sciences (EUA) em um *μParaflo microfluidic chip* usando uma bomba de microcirculação (Atactic Technologies, EUA). As sondas presentes no chip são sintetizadas quimicamente e consistem de uma sequência complementar à dos miRNAs de planta presentes no miRBase, sequências customizadas ou controle ligadas a um composto de polietilenoglicol que tem a função de afastar a sonda do substrato. Para balancear a temperatura de *melting* das sondas, algumas bases quimicamente modificadas são utilizadas no processo de confecção do microarranjo.

As hibridações são feitas com duas amostras marcadas com corantes diferentes, sendo uma delas sempre o controle irrigado e a outra submetida a seca. Outras duas réplicas biológicas foram usadas em um *dye-swap* dos fluoróforos Cy3 e Cy5 (Rocha et al., 2007). Todas as réplicas foram utilizadas, totalizando oito microarranjos (Tabela 3.1).

O ensaio sempre partiu da quantidade inicial de 5 μ g de RNA total, que foi fracionado por centrifugação e um equipamento YM-100 Microcon (Millipore). As sequências de menor peso molecular (< 300 nt) foram isoladas tiveram uma cauda poli-A adicionada por uma polimerase adequada. Um oligonucleotídeo (*tag*) foi então ligado por uma T4 DNA ligase à cauda poli-A, para ser utilizada no processo de marcação; cada amostra de um *chip* tem *tags* distintas. A hibridação foi realizada *overnight*. O protocolo de hibridação utiliza ainda 100 μ L de tampão 6xSSPE (0,90 M NaCl, 60 mM Na₂HPO₄, 6 mM EDTA, pH 6,8) contendo 25% de formamida a 34°C. Os corantes

Tabela 3.1: Lista dos *chips* de microarranjo utilizados para caracterizar a expressão de miRNAs em folhas de cana-de-açúcar sob estresse por seca.

Chip	Cy3	Cy5
MIRCANA 1	TI.a	TS.a
MIRCANA 2	TS.b	TI.b
MIRCANA 3	SI.a	SS.a
MIRCANA 4	SS.b	SI.b
MIRCANA 5	TI.c	TS.c
MIRCANA 6	TS.d	TI.d
MIRCANA 7	SI.c	SS.c
MIRCANA 8	SS.d	SI.d

T: variedade RB867515 e S: variedade RB855536. Campo Irrigado (I) ou Seco (S). As letras minúsculas diferenciam réplicas biológicas.

Cy3 e Cy5 (que ligam-se às tags específicas anteriormente inseridas) foram aplicados em seguida. As imagens dos microarranjos foram obtidas com um *scanner* de alta resolução (GenePix 4000B, Molecular Device) e digitalizadas no programa Array-Pro (Media Cybernetics).

A empresa enviou as imagens originais e já processadas, o arquivo de layout do array, dados brutos e dados processados com testes estatísticos básicos. Os dados das intensidades numéricas, extraídas dos controles, *background* e sondas de miRNAs, foram inseridos no servidor do projeto. Os dados foram processados para subtrair o sinal de *background* pelo método de regressão local. A normalização dos dados foi feita através do LOWESS (Locally-weighted Regression), um método cíclico para remover variações técnicas, como variação de quantidade de amostra e de corantes de marcação, revelando variações biológicas relevantes. Em seguida foi aplicado o teste T para identificar miRNAs diferencialmente expressos. Além disso, os sinais, transformados para $\log_2$, foram utilizados para obter a razão entre as amostras comparadas diretamente. Os miRNAs relevantes para p-values 0,01, 0,05 e 0,10 foram considerados nos resultados, separadamente.

3.4 Validação por qPCR

A confirmação da expressão de miRNAs foi feita tal como descrito por Chen et al. (2005), exceto pela enzima utilizada e suas soluções tampão, substituídos pelos componentes do kit SuperScript III (Lifetech, EUA). As variedades RB92579, RB867515, RB855536 e RB72454, com duas réplicas biológicas para cada tratamento, foram utilizadas nestes ensaios.

Para que seja possível a amplificação de miRNAs maduros (19 a 24 bases) são necessários três *primers* especiais. O *primer stem-loop* tem aproximadamente 50 nucleotídeos e forma um grampo estável apenas a baixas temperaturas. Sua complementaridade com o miRNA alvo é de apenas 6 bases da região 3'. O *primer* direto é praticamente igual ao miRNA alvo, exceto pelas bases que se anelam ao *stem-loop* e uma extensão 5' com função apenas termodinâmica. O reverso é usado em qualquer amplificação de miRNAs, pois é complementar ao trecho universal que forma o grampo do primeiro *primer*. A figura 3.1 ilustra o processo resumidamente. Estes primers foram desenhados em conformidade com a metodologia de Chen et al. (2005).

Foram utilizados 2.5 μg de RNA total para tratamento com DNase (Fermentas, EUA), adição do primer *stem-loop* a 1 μM , oligo dT 50 μM e dNTPs a 10 mM. Em seguida foram adicionados o 200 U/ μL da enzima Superscript III (Lifetech,EUA) e seu tampão 5X First Strand, além de 0.1M de DTT e 40U/ μL de RNaseOut. A reação foi incubada num termociclador Veriti(Lifetech, EUA) por 30 min a 16 °C, para então passar por 60 ciclos de 30 segundos a 30 °C, 30 s a 42 °C e 1 s a 50 °C. Finalmente a reação foi incubada por 5 min a 85 °C, desativando a enzima. Em seguida, para a PCR em tempo real no equipamento ABI 7500 (Lifetech, EUA), foram misturados 2 μL da reação anterior, 1 μL de primer direto específico (10 μM) e 1 μL de primer reverso universal (10 μM), 10 μL de SYBR Green Master mix (Lifetech,EUA). A reação tem uma etapa de 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 minuto.

O software do ABI 7500 avalia as condições da reação automaticamente, verificando a curva de dissociação do *reporter*, desvio padrão das réplicas técnicas, C_t médio das mesmas e expressão

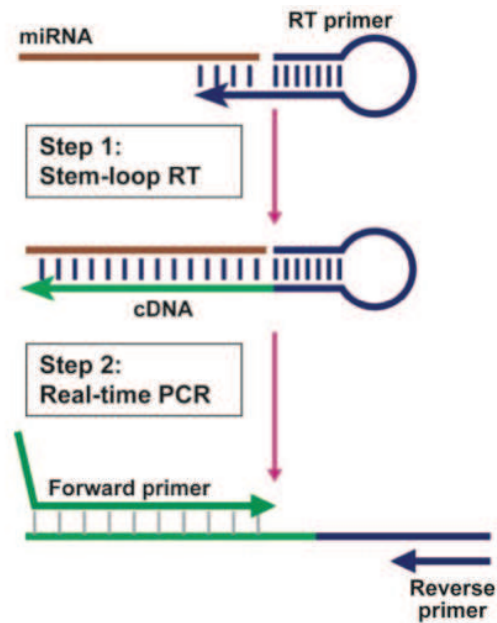


Figura 3.1: Resumo do processo de amplificação de miRNAs para qPCR. O *primer stem-loop* é utilizado para estender o miRNA maduro durante a síntese de cDNA. O *primer forward* é pequeno e por isso podem ser necessárias bases adicionais na extremidade 5' para garantir estabilidade ideal. O *primer* reverso é universal, utilizado com todos os miRNAs, pois sempre se anela ao trecho que forma o grampo do primeiro oligonucleotídeo. Adaptado de Chen et al. (2005)

normalizada a partir de um gene de referência (poliubiquitina). No entanto, estes últimos valores foram descartados e recalculados a partir dos C_t médios das réplicas biológicas, segundo o método $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen, 2001).

Capítulo 4

Resultados e discussão

4.1 Confecção dos chips de microarranjo

Num primeiro momento foi realizado um trabalho de predição de precursores de miRNAs presentes no SUCEST. Todo o conjunto de *clusters consensi* do projeto SUCEST (Vettore et al., 2001) foi submetido a uma seleção através do algoritmo blastx, contra a base não-redundante (nr) do NCBI. O objetivo foi excluir as sequências codificantes de proteína da busca por miRNAs, visto que sem os íntrons, estas sequências não poderiam conter miRNAs. O grupo de ESTs, que anteriormente continha mais de 43000 membros foi reduzido para 11054. Nesta análise foi considerado como limiar de seleção o *e-value* de 1e-05.

Os 11054 *clusters* foram então submetidos ao blastn contra a base de dados construída localmente contendo todas as sequências de miRNAs de *Arabidopsis thaliana*, *Oriza sativa* e *Zea mays*. A escolha de espécies próximas, além da planta modelo *A. thaliana*, visou aumentar as chances de encontrar miRNAs menos conservados. Naquele momento, *Sorghum bicolor* tinha apenas alguns miRNAs muito similares aos encontrados nas outras três espécies. Hoje, entretanto, com a versão atual do miRBase, sorgo seria uma adição importante ao conjunto de dados.

A natureza do teste estatístico que gera o e-value poderia prejudicar os resultados da comparação entre os miRNAs, por conta do tamanho das sequências de miRNAs maduros (21 pb). Para contornar este problema foi utilizado um e-value = 1000, deixando os critérios da triagem subsequente dos resultados como principal crivo. Foram também determinados word size = 7, o limite de 1000 alinhamentos e o filtro de baixa complexidade. Recentemente foi liberada uma versão reformulada do Blast, que contem programas (ex.: blastn-short) melhor adaptados a pequenas sequências, eliminando esta dificuldade.

A triagem foi realizada buscando alinhamentos com no máximo 4 *mismatches*, o que gerou uma lista com 114 candidatos (555 alinhamentos) a partir do miRBase. A maioria dos 16 miRNAs já preditos em cana-de-açúcar foi encontrada nesta análise, mas alguns não se encaixaram nos critérios utilizados. Os miRNAs identificados e depositados no miRBase (Zhang et al., 2005) não foram validados experimentalmente.

Os microarranjos foram confeccionados nos E.U.A com sondas complementares a todo o conjunto de miRNAs maduros de plantas disponível no miRBase 14.0. Além destas sequências, outros cem *spots* estavam disponíveis no chip para inclusão de sondas personalizadas. O conjunto de 114 candidatos a miRNA obtido em análise anterior foi filtrado, eliminando 14 candidatos com mais de 4 *mismatches* e alta similaridade com outros *clusters* presentes na lista. Esta atividade foi testada em outras ocasiões e atualizada imediatamente antes da encomenda dos chips, garantindo que seus resultados fossem condizentes com as últimas informações disponíveis no genbank e no miRBase.

4.2 Perfil de expressão de miRNAs em microrranjos

O perfil de expressão dos miRNAs foi aferido em amostras oriundas de ensaios de campo com 2 variedades (RB867115 e RB855536), sob 2 tratamentos (controle irrigado vs tratamento sem irrigação). Cada ponto experimental forneceu quatro réplicas de folha +1 (primeira folha

cuja lígula é aparente). A tabela 4.1 contém todos dos dados de espectrofotometria utilizados para aferir a qualidade do RNA total. Todas as amostras foram eluídas em 80 μL de água tratada com DEPC, o que resulta numa quantidade final de RNA mais que suficiente para os ensaios de microarranjo. As hibridações foram realizadas nos EUA, pela empresa LC Sciences. Os primeiros quatro *chips* foram hibridados no fim de setembro de 2009 e, após análise, novas amostras foram processadas e enviadas no início de dezembro para as outras quatro hibridações. O resultado foi normalizado entre todos os microarranjos.

Tabela 4.1: Qualidade das amostras de RNA total de folhas +1 de cana-de-açúcar utilizadas nos ensaios de microarranjo para análise de expressão de miRNAs.

Amostra	Razão 260/280	Conc. ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Amostra	Razão 260/280	Conc. ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
TI.a	1,891	0,234	SI.a	1,982	0,280
TI.b	1,952	0,286	SI.b	1,916	0,284
TI.c	2,002	0,563	SI.c	1,989	0,411
TI.d	2,005	0,466	SI.d	2,000	0,636
TS.a	2,012	0,364	SS.a	1,796	0,233
TS.b	1,855	0,226	SS.b	1,926	0,325
TS.c	2,014	0,564	SS.c	2,057	0,265
TS.d	1,994	0,592	SS.d	2,032	0,428

Variedades T: RB867515 e S: RB855536. Campo Irrigado (I) ou Seco (S). As letras minúsculas diferenciam réplicas biológicas.

Os resultados das hibridações foram enviados pela empresa, contendo dados brutos e imagens, além da análise básica (normalização e testes estatísticos) e comparativa entre todos os *chips*. Este segundo conjunto de resultados foi obtido com a normalização dos sinais entre chips diferentes e teste T de student para determinar quais sondas reportavam miRNAs diferencialmente expressos (Tabela 4.2). As hibridações permitiram a identificação de 12 candidatos a miRNAs relacionados ao déficit hídrico em diferentes comparações. As comparações TI vs TS e SI vs SS (onde T = RB867515 e S = RB855536, e I = irrigado e S = sequeiro), consolidam os dados de todas as réplicas biológicas e diferenciam os tratamentos. Outros dois testes, TI vs SI e TS vs SS, permitem inferir

quais seriam as diferenças na expressão de miRNAs nas variedades com respostas contrastantes. Os sinais mostraram-se muito variáveis, o que é esperado num experimento de campo. Embora houvesse outros miRNAs significativamente relevantes (dados não mostrados), os seus sinais eram muito baixos, o que pode prejudicar a análise em razão da influência do *background*. Além disso, os miRNAs em questão eram muito pouco expressos tanto sob irrigação constante quanto sob estresse. Os dados permitem inferir que há uma diferença intrínseca entre as variedades em relação ao nível de expressão de alguns de miRNAs, além da distinta regulação dos miRNAs durante a adaptação à condição de privação de água.

Tabela 4.2: miRNAs diferencialmente expressos significativamente (Teste t de student, $P < 0,1$) para cada comparação entre amostras de folhas de cana-de-açúcar.

Comparação(G1 vs G2)	Nome da sonda	p-value	Log2 (G1/G2)
TI vs TS	osa-miR1436	$4,08E-02$	-0,84
TI vs SI	ppt-miR167	$9,06E-02$	-0,56
TS vs SS	ppt-miR167	$3,64E-03$	-0,77
TS vs SS	ppt-miR894	$2,04E-02$	-0,65
TS vs SS	vvi-miR167c	$4,60E-02$	-0,82
TS vs SS	ppt-miR160b	$6,18E-02$	0,89
TS vs SS	ath-miR160a	$7,10E-02$	1,06
TS vs SS	ath-miR156g	$7,64E-02$	0,41
TS vs SS	osa-miR530-5p	$8,36E-02$	1,31
TS vs SS	ptc-miR530a	$8,55E-02$	1,74
SI vs SS	vvi-miR319b	$4,57E-02$	0,38
SI vs SS	gma-miR319a	$6,31E-02$	0,35
SI vs SS	sof-miR159e	$7,98E-02$	0,56

Variedades T: RB867515 e S: RB855536. Campo Irrigado (I) ou Seco (S).

A partir dos dados do chip de microarranjo foi possível identificar novos miRNAs candidatos de cana-de-açúcar. Segundo a empresa, a hibridação é suficientemente sensível para permitir que se determine a sequência do miRNA ligado a sonda. Os dados não são publicamente disponíveis, mas segundo o fabricante (LC Sciences), um *mismatch* próximo das extremidades da sequência faz com que o sinal detectado seja ao menos 30 vezes menor do que seria sem *mismatch* algum. Baseando-se nesse dado, foi estimado um limiar de sinal igual a 500, suficientemente alto para garantir que a grande maioria das sondas acima desse ponto tenham hibridado com no máximo 1

mismatch (Figura 4.1). O limiar, coincidentemente, é o mesmo nível considerado pela LC Sciences para determinar resultados que podem ser dados como confiáveis, acima do *background*.

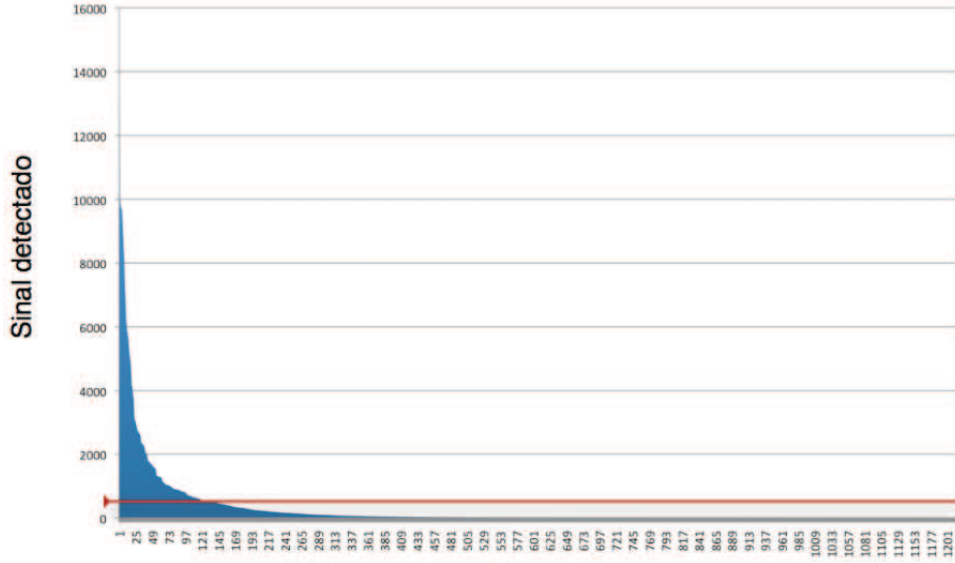


Figura 4.1: Sinal médio de todas as sondas nos chips MIRCANA. Sinais abaixo da linha vermelha foram descartados para efeito de determinação de sequência de novos miRNA. Os números do eixo x são identificadores das sondas (são 1201 sondas utilizadas no chip).

Aparecem 139 sequências acima deste limite, sendo que apenas as sondas cujos sinais foram maiores que 500 nas quatro réplicas do mesmo ponto experimental foram consideradas. Assim, foram identificados 50 miRNAs de cana-de-açúcar expressos com sinal médio superior a 500 em pelo menos uma das variedades, sob irrigação ou sequeiro, em plantas de 7 meses (Tabela C.1). Em seguida, as sequências complementares às sondas foram analisadas com o algoritmo blastn-short contra todo o conjunto de *clusters* SUCEST. Todos os mRNA encontrados também foram comparados com a base de sequências não-redundantes do Genbank com o uso do algoritmo blastn, a fim de tornar possível a distinção entre possíveis alvos e precursores de miRNA. Foram levados em consideração apenas *hits* totalmente complementares ou com 1 *mismatch* ou 1 *gap*. No entanto, a avaliação de *hits* revelou que apenas oito *clusters* do SUCEST são 100% complementares às sondas selecionadas (Tabela 4.3). Destes oito precursores, sete correspondem a miRNAs de *Sac-*

Tabela 4.3: miRNAs expressos nas variedades RB867515 e RB855536 e seus respectivos precursores.

Sonda	Sequência	SAS	miRBase
ath-miR156a	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC	SCSBAD1086B12.g	sof-miR156
ptc-miR159d	CUUGGAUUGAAGGGAGCUCCU	SCAGFL3025B10.g	sof-miR159c
osa-miR159a.1	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUG	SCJFRZ1007C01.g	sof-miR159a
gma-miR167c	UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUG	SCSFSD1065B12.g	sof-miR167b
gma-miR167c	UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUG	SCMCSD2060C04.g	sof-miR167b
osa-miR168a	UCGCUUGGUGCAGAU CGGGAC	SCMCLR1010B03.g	sof-miR168a
osa-miR168a	UCGCUUGGUGCAGAU CGGGAC	SCCCST1005H07.g	sof-miR168a
osa-miR528	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	SCUTSD1026H02.g	Ausente

NM: número de *mismatches*, TM: tamanho do miRNA maduro.

charum spp. já registrados no miRBase. O sof-miR528 é o único entre 50 novos miRNAs putativos cujo possível precursor primário pôde ser identificado no SUCEST pela primeira vez. Por não ser diferencialmente expresso, o sof-miR528 não foi incluído nos experimentos iniciais de validação, mas será alvo de atividades futuras. Os *clusters* identificados como precursores tiveram sondas personalizadas inclusas no *chip* e estiveram entre os miRNAs mais expressos em folha, independentemente de tratamento ou variedade (Tabela C.2). A única exceção, SCAGFL3025B10.g, é semelhante a ptc-miR159d (*Populus trichocarpa*), cuja sonda também está entre as de maior sinal médio.

A partir destas evidências pode-se inferir que o sequenciamento de ESTs que deu origem ao SUCEST só pôde encontrar alguns dos miRNAs mais abundantes. Folhas de plantas adultas não foram sequenciadas no SUCEST, o que pode explicar nele a ausência de outros miRNAs com alto nível de expressão.

Parte dos miRNAs expressos em cana-de-açúcar têm alvos que foram identificados no SUCEST. Para tanto, os resultados obtidos com o servidor psRNATarget (expectation < 3) e com o programa blastn-short foram inspecionados.

Em plantas, geralmente, os miRNAs maduros são altamente complementares a trechos dos

alvos, contendo poucos *mismatches*, preferencialmente fora do sítio de clivagem (Jones-Rhoades, 2004; Jung et al., 2009). Tomando como diretrizes essas informações, os candidatos a alvos no SUCEST foram considerados aqueles com mais de 17 bases de identidade, sem *mismatches* entre as bases 8 e 13. Além disso, *clusters* pequenos (< 500 nt) e sem qualquer anotação de proteínas ou domínios homólogos no SUCEST foram desconsiderados. Em seguida foi utilizado o blastx para buscar proteínas conhecidas com cadeia de aminoácidos similar aos ESTs identificados. Proteínas hipotéticas, especialmente se possuísem sequências homólogas no genoma do sorgo, também foram admitidas como possíveis alvos.

A quase totalidade dos alvos identificados tem como melhor *hit* alguma sequência do genoma de *Sorghum bicolor*. Infelizmente, na maior parte dos casos a anotação é deficiente. Portanto, para identificar a possível função dos alvos de miRNAs de cana-de-açúcar, foi também considerado o melhor *hit* cuja proteína codificada é conhecida em outra espécie, em cada conjunto de alinhamentos. A tabela 4.4 relaciona os alvos encontrados no SUCEST e seus homólogos conhecidos em outras plantas, quando aplicável. Quase todas as proteínas encontradas são ou apresentam características de fatores de transcrição, o que é comum para alvos de miRNA (Jones-Rhoades et al., 2006).

O miR159 foi reprimido por seca na variedade sensível RB855536. De forma similar, Wei et al. (2009) mostraram que esse miRNA é reprimido por seca em folhas de milho. Um dos possíveis alvos do miR159 são proteínas da família de fatores de transcrição MYB (Allen et al., 2007). No SUCEST, o alvo candidato de miR159 parece pertencer a família de fatores de transcrição MYB. Embora o miR159 não tenha se mostrado diferencialmente expresso na variedade mais tolerante, não se pode afirmar que seu papel não é relevante neste caso sem mais experimentos.

O miR160 apresentou maior expressão na variedade RB867515 quando ambas variedades são comparadas em condições de seca. O homólogo desse miRNA em milho foi reprimido por seca (Wei et al., 2009) e induzido por estresse salino (Ding et al., 2009). Esses mesmos autores identificaram que os prováveis alvos desse miRNA são genes que codificam a proteína ribossomal S16 e do

Tabela 4.4: Proteínas no banco de dados SUCEST identificadas como alvos de miRNAs expressos em cana-de-açúcar.

miR	SAS	Proteína alvo (espécie)	Accession
156	SCEZLB1008D09.g, SCCCAM1004F03.g	SBP-domain protein 5 (Zma)	CAB56631
	SCJFRZ2027B09.g	squamosa promoter-binding-like 9 (Zma)	ACG45113
	SCRFAD1023F12.g	squamosa promoter-binding-like 2 (Osa)	Q0JGI1
	SCSGRT2063H06.g	Teosinte glume architecture 1 (Zdi)	AAX83777
	SCRLAM1005E03.g	squamosa promoter-binding-like 7 (Osa)	Q01JD1
	SCBFSB1048A12.g	squamosa promoter-binding-like 17 (Osa)	A3C057
	SCCCFL1003C01.g	squamosa promoter-binding-like (Bpl)	AAY16440
	SCJFRZ2007E02.b	squamosa promoter-binding-like 3 (Osa)	A2X0Q6
	SCBGST3111E10.g	Desconhecida (Sbi)	XP_002450775
	SCVPFL1133B06.g	Desconhecida (Sbi)	XP_002462902
159	SCJLRZ1023B09.g	Fator de transcrição GAMYB (Osa)	A2WW87
160	SCJLLR1107A02.g	Auxin responsive factor 16 (Osa)	AAP54297
	SCEPAM2013C09.g	Auxin responsive factor 10 (Osa)	BAB85919
167	SCVPLR2027A05.g	Auxin responsive factor 12 (Osa)	Q258Y5
	SCCCLR1024F10.g	Auxin responsive factor 6b (Osa)	BAB85915
	SCEZLB1008F08.g	Auxin responsive factor 17b (Osa)	A2YG67
	SCBGST3106E01.g	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 23 (Zma)	ACG35105
168	SCCCCL3005C12.b, SCCCLR2004H12.g	Argonaute 1B	Q7XSA2
396	SCJLLR1033C02.g	atGRF2 (Zma)	ACG33150
	SCJFST1048G04.g	Putative Growth regulation factor 6 (Zma)	NP_001106025
	SCRFFL5043G11.g	Putative Growth regulation factor 12 (Zma)	SCRFFL5043G11.g
	SCJLRZ1020B01.g	atGRF2 (Zma)	ACG42410
530	SCJLRZ1021C03.g	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (Rco)	XP_002525787
1436	SCJFRZ2014B07.g	Proteína da família VQ motif (Zma)	NP_001151100
2914	SCJLRT1013A05.g	charged multivesicular body protein 2a (Zma)	ACG31990

SAS. Sugarcane Assembled Sequence. Homólogos em *Arabidopsis thaliana* (Ath); *Oryza sativa* (Osa); *Sorghum bicolor* (Sbi); *Zea diploperennis* (Zdi); *Bethula platyphyla* (Bpl); *Ricinus communis* (Rco)

fator de transcrição ARR11, envolvido na transdução de sinais de citocinina (Mason et al., 2005). Não foram encontradas informações sobre a ligação entre a proteína S16 e estresse em plantas, porém, o hormônio citocinina pode ter um papel importante na tolerância à seca (Rivero et al., 2007, 2009). Os autores produziram plantas transgênicas de tabaco superexpressando o gene de uma isopenteniltransferase, que controla uma etapa limitante da via de biossíntese de citocinina.

Essas plantas apresentaram níveis maiores de citocinina, o que aumentou a tolerância à seca. Essa melhor performance está associada a um aumento na fotorrespiração, que protegeria os processos da fotossíntese (Rivero et al., 2009). Assim como identificado em cana-de-açúcar neste estudo, os alvos do miR160 em *Arabidopsis* são os fatores responsivos a auxina ARF10, ARF16 e ARF17 (Mallory et al., 2005).

Covarrubias e Reyes (2010) discutem os efeitos da expressão de miR159 e miR160 sob estresse hídrico em *Arabidopsis*. O primeiro reprime AtMYB33 e AtMYB101, o que provoca diminuição da sensibilidade ao ABA durante a germinação. O mesmo efeito é observado em mutantes *atmyb33* e *atmyb101*. Da mesma forma, o miR160 modula a resposta ao ABA através dos seus alvos da família ARF. Plantas mutantes com uma versão de ARF10 insensível ao miR160 apresentaram alta sensibilidade a ABA. O principal efeito do ABA em folhas é o fechamento estomático (Chaves et al., 2003), sabidamente importante para a resposta a seca. Assim, é possível afirmar que os dois miRNAs atuam de forma semelhante na resposta a seca, embora estágios de desenvolvimento e tecidos diferentes possam alterar parcialmente essa relação. O presente trabalho mostra que ambos miRNAs apresentam padrão de menor expressão sob seca na variedade mais sensível, o que presumivelmente a torna menos sensível ao ABA no que diz respeito aos seus efeitos na folha em plantas adultas.

Nas comparações entre as variedades foi possível observar que miR167 é menos expresso na variedade tolerante, tanto em condições de irrigação como de seca. Embora não tenhamos observado repressão por seca em nenhuma das hibridações comparando irrigado vs seca nas hibridações, esse dado é interessante pois indica que a repressão de miR167 em situação de falta de água pode ser um componente importante da resposta da planta. Esse miRNA é reprimido por seca em folhas de milho, processo que causa aumento dos níveis dos genes alvos que codificam proteínas com atividade fosfolipase D, fatores de resposta a auxina e um possível fator de alongação (Wei et al., 2009). Esses autores levantaram a hipótese de que o miR167 esteja envolvido com fechamento estomático e as respostas a estresse oxidativo. Já na patente WO/2008/115487 (Coruzzi et al.,

2008), o miR167 foi superexpresso em plantas de *Arabidopsis*. O miR167 reprime a expressão do gene que codifica o fator de transcrição ARF8, que modula a ativação de diversos genes envolvidos na resposta à auxina. Coruzzi et al. (2008) observaram que o miR167 responde a condições de deficiência em nitrato e que a superexpressão do miR167 causa diferenças fenotípicas em plantas jovens um aumento das raízes laterais, com um consequente aumento da superfície explorada por plantas. Com isso houve maior eficiência metabólica, maior absorção de nutrientes, maior taxa de crescimento e produtividade. O miR167 de cana é um bom alvo para estudos futuros.

O miR319, conservado entre dicotiledôneas e monocotiledôneas, foi reprimido por seca na variedade sensível. Sunkar et al. (2008) sequenciaram bibliotecas de miRNA em plantas de arroz sob condições controle, estressada por seca e por presença de altos níveis de NaCl. A análise da frequência com que o homólogo de arroz foi sequenciado nessas bibliotecas indica que ele é reprimido por seca em arroz (Sunkar et al., 2008). Há, portanto, a perspectiva de regulação diferencial desse miRNA em cana, sendo particularmente interessante que ele tenha sido reprimido na variedade sensível. Esse miRNA controla a expressão do gene *Lanceolate (La)*, que está envolvido no controle da morfologia de folhas de tomate (Ori et al., 2007). Gu et al. (2010) observaram que esse miRNA é induzido por deficiência de Pi em folhas de tomate e que um dos possíveis alvos é uma proteína similar ao fator de transcrição TEOSINTE BRANCHED1 (TB1). Esse fator de transcrição reprime a ramificação (branching) da parte aérea em monocotiledôneas (Doebley et al., 1997). Já Schommer et al. (2008) observaram que o miR319 está envolvido no controle de genes relacionados com a síntese do hormônio metil jasmonato. Os autores sugerem que esse miRNA atua reprimindo o crescimento de folhas e ativando a senescência foliar. Esses dados em outras espécies indicam que o miR319 controla diversos aspectos do desenvolvimento e fisiologia da folha, em conformidade com os dados fisiológicos que observamos nas plantas de cana em campo. O envolvimento do miR319 na tolerância a estresses foi recentemente exposto na patente WO/2008/133643 (Allen et al., 2008). Os autores desenvolveram *decoy sequences* (seqüências que capturam o miR319) bem como versões mutantes dos genes alvo (para que eles não sejam reconhecidos pelo miR319), sendo que as plantas com essas alterações apresentaram maior tolerância

a diversos estresses.

O miR156 regula fatores de transcrição do tipo SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE (SPL), que estão envolvidos no controle do florescimento e diversos outros aspectos do desenvolvimento vegetal (Wu and Poethig, 2006; Gandikota et al., 2007). Hsieh et al. (2009) observaram que o miR156 é induzido por deficiência de Pi, N e K em raízes de *Arabidopsis*, mas sua expressão não é alterada em folhas submetidas a esses e outros estresses. No entanto, o exato papel desse miRNA na resposta a estresses está ainda por ser definido. Uma possível explicação associada à defesa da planta pode ser obtida a partir dos dados de uma patente recente, na qual foi demonstrado que a superexpressão de miR156 em plantas transgênicas de *Arabidopsis* aumenta em muito a ramificação dos brotos, com um impacto positivo na quantidade de biomassa da planta (Weigel and Schwab, 2005). Em cana-de-açúcar, esse miRNA foi mais expresso na variedade tolerante em comparação com a variedade sensível quando ambas estão sob déficit hídrico. Pode-se especular que sua expressão poderia contribuir para a manutenção do desenvolvimento foliar. Portanto é razoável que as plantas da variedade mais afetada pelo estresse tenham sua expressão diminuída em relação a variedade tolerante.

O miR1436 foi identificado como reprimido por seca em arroz Sunkar et al. (2008), em conformidade com os dados que observamos. Aparentemente esse miRNA é conservado em monocotiledôneas e seu alvo são proteínas de função desconhecida, segundo as análises feitas em arroz e os resultados de predição de alvos deste estudo. O mesmo miRNA também foi identificado em um estudo de caracterização de miRNAs em milho Zhang et al. (2009), onde é citada a atual discussão sobre a reclassificação de certos miRNAs associados a transposons, como é o caso do miR1436.

4.3 qPCR

Tendo em vista a confiabilidade dos resultados de qPCR, miRNAs que tiveram possíveis precursores identificados no SUCEST foram selecionados para o desenho de primers (Tabela 4.5).

Nenhum deles é perfeitamente complementar, mas um máximo de 2 *mismatches* foi tolerado em relação à sonda.

Tabela 4.5: Lista de miRNAs associados a resposta à seca em cana-de-açúcar cujos precursores foram entrados no SUCEST.

Nome	Sequência	Sonda	NM (nt)	TM
miR319	CUUGGAGUGAAGGGAGCUCCA	vvi-miR319b	1	21
miR156	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC	ath-miR156g	1	20
miR159	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUG	sof-miR159e	2	21
miR160	UGCCUGGCUCUCCUGUAUGCCA	ath-miR160a	1	21
miR167	UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUG	vvi-miR167c	1	21
miR1436	ACAUUUUGGAACGGAGGGAGU	osa-miR1436	2	21

NM: número de *mismatches*, TM: tamanho do miRNA maduro.

Inicialmente foram conduzidos testes para estabelecer a metodologia que seria utilizada para amplificação de miRNAs maduros. Grande parte dos trabalhos recentes utiliza um de dois principais métodos Chen et al. (2005); Varkonyi-Gasic et al. (2007). O segundo é derivado do método de Chen, com modificações importantes em algumas etapas. Nos testes de protocolo, dois dos cinco miRNAs (miR159 e miR167) foram amplificados como esperado e seus primers tiveram eficiência de quase 100% (R2 acima de 0.997). Os outros *primers* geraram produtos muito inespecíficos ou nenhum produto. Examinando os resultados de blast dos miRNAs obtidos nos chips contra os *clusters* SUCEST, foi constatado que os *primers* em questão poderiam ser capazes de amplificar outros possíveis membros das mesmas famílias de miRNAs, o que alteraria os resultados de expressão sem que fosse possível detectar o desvio. O miRNA 160 teve novos *primers* desenhados e passou a produzir amplificações com sucesso. Dessa forma, apenas os dois miRNAs devidamente amplificados foram mantidos, juntamente com o miR160. A Tabela 4.6 contém as sequências dos *primers* utilizados para o experimento de qPCR. As amostras de RNA total foram extraídas de réplicas biológicas distintas das utilizadas nas hibridações em microarranjo. Também foram obtidas amostras de plantas de três e onze meses, oriundas do mesmo experimento de campo. Os experimentos de qRT-PCR foram planejados para quatro variedades, visando melhor aproveitamento dos expe-

Tabela 4.6: *Primers* usados nos experimentos de qPCR para validação da expressão de miRNAs diferencialmente expressos.

Nome	Sequencia (5'-3')	Nt	Tm (°C)
loop-RT159	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGAT ACGACCAGAGC	50	99
loop-FW159	GCGGTTTGGATTGAAGGGA	19	59.5
loop-RT160	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGAT ACGACAGGCAT	50	99
loop-FW160	GGCTGCCTGGCTCCCTGT	18	61.6
loop-RT167	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGAT ACGACCAGATC	50	99
loop-FW167	CCGTGAAGCTGCCAGCAT	18	58.5
reverse universal	GTGCAGGGTCCGAGGT	16	58.4

RT: *primer stem-loop* para síntese de cDNA , FW: *primer* direto, reverse universal: *primer* reverso, Nt: tamanho em nucleotídeos. Os números nos nomes de cada *primer* identificam os miRNA de cana-de-açúcar amplificados.

rimentos de campo e a reprodutibilidade dos padrões de expressão em outros genótipos. Portanto, em adição às duas variedades escolhidas como referência para o estudo do chip, foram escolhidos os cultivares RB92579 (tolerante) e RB72454 (sensível). Estas duas variedades apresentaram os resultados mais contrastantes nos testes fisiológicos (Anexo A).

Para confirmar a condição de estresse das plantas de campo, um gene que codifica uma desidrina, reconhecidamente responsivo ao déficit hídrico em cana de açúcar (Labhilili et al., 1995; Wood and Goldsbrough, 1997; Rocha et al., 2007), foi avaliado quanto à sua expressão também em PCR quantitativa em tempo real. A figura 4.2 contém dados da expressão da desidrina (produto de 70 nt obtido com *primer* direto: GGCGGAAGGAGGAAGAAGG e *primer* reverso: CCGTGCGGTGCTGGTTGTC). Os resultados são condizentes com a literatura e se alinham com as evidências fisiológicas de estresse das plantas estudadas (Anexo A).

Três dos miRNAs identificados como diferencialmente expressos nos microarranjos tiveram sua expressão verificada com a técnica de qPCR após modificações bem sucedidas no protocolo. O miRNA159 teve sua expressão reprimida no resultado dos microarranjos em plantas da variedade sensível aos 7 meses. O resultado não foi confirmado por qPCR. Aos 3 meses o padrão de expressão se reproduz de forma semelhante em todas as variedades, o que deixa de acontecer nos outros

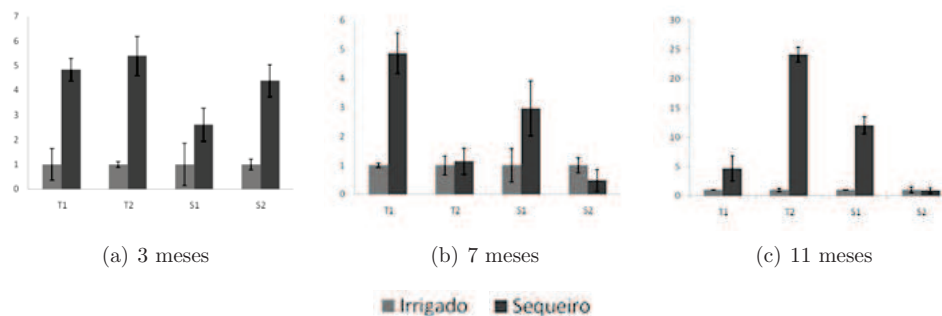


Figura 4.2: Expressão da dehidrina aos 3, 7 e 11 meses de plantio, sob irrigação e sequeiro, nas variedades RB867515 (T1), RB92579 (T2), RB855536 (S1) e RB72454 (S2).

períodos (Figura 4.3). Aos 7 meses, a variedade RB92579 apresenta leve repressão, mas a variedade RB72454 mostra indução da expressão de miR159.

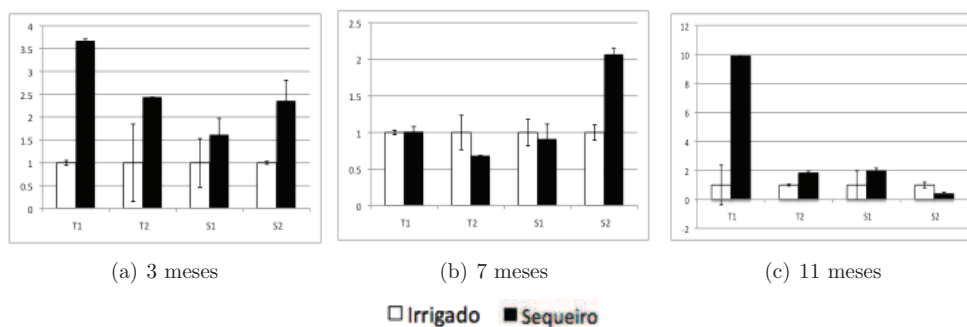


Figura 4.3: ‘Fold change’ da expressão do miR159 em sequeiro (preto) em relação a sua expressão em campo irrigado (branco). Cada gráfico contém dados das quatro variedades utilizadas: RB867515 (T1), RB92579 (T2), RB855536 (S1) e RB72454 (S2).

No caso do miR160, a expressão diferencial nos chips ocorreu entre as variedades num mesmo tratamento (sequeiro), sendo que a expressão é menor na variedade sensível. Os resultados (Figura 4.4) corroboram os resultados em amostras de 7 meses. Aos 3 e 11 meses ocorrem diferentes padrões de expressão, o que isola o resultado obtido como característico do estágio de desenvolvimento das plantas de 7 meses.

Outro miRNA testado foi o miR167, cuja expressão detectada nos chips foi significativamente

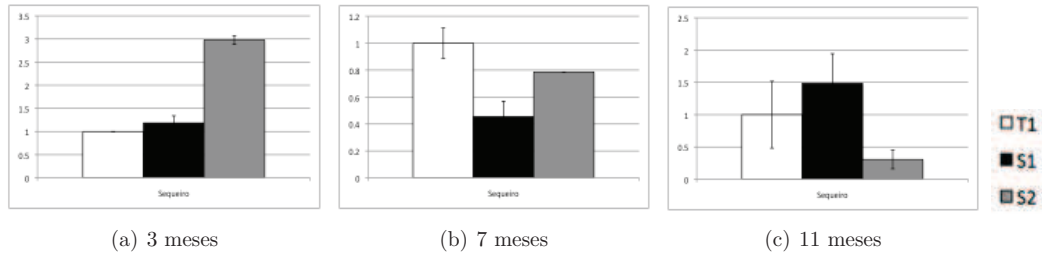


Figura 4.4: ‘Fold change’ da expressão do miR160 em variedades sensíveis (preto e cinza) em relação a sua expressão na variedade tolerante (branco) sob sequeiro. Cada gráfico contém dados das variedades RB867515 (T1, branco), RB855536 (S1, preto) e RB72454 (S2, cinza).

maior na variedade sensível (RB855536) em ambos tratamentos. O experimento de qPCR não validou totalmente o resultado encontrado nos chips, como ilustra a figura 4.5. Aos 7 meses, os dados de qPCR das amostras de plantas irrigadas correspondem ao que apontam as análises de microarranjo, mas o mesmo não repete sob estresse. Mais uma vez, os dados de outros tempos experimentais indicam que o estágio de desenvolvimento pode afetar os padrões de expressão de forma dependente do genótipo e do tratamento.

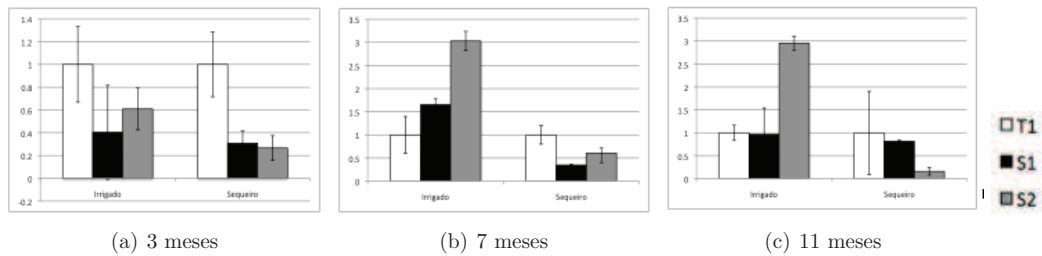


Figura 4.5: ‘Fold change’ da expressão do miR167 em variedades sensíveis (preto e cinza) em relação a sua expressão na variedade tolerante (branco) nos dois tratamentos. Cada gráfico se refere a um período após o plantio e contém dados das variedades RB867515 (T1, branco), RB855536 (S1, preto) e RB72454 (S2, cinza).

Parte III

Identificação de miRNAs de
cana-de-açúcar sob seca usando
sequenciamento de nova geração.

4.4 Introdução

Com a análise dos dados apresentados na parte II, constatou-se que as informações não eram suficientemente abundantes e precisas para que fosse possível determinar, a partir delas, quais miRNAs de cana-de-açúcar influenciam a resposta a seca da planta.

Tendo em vista o cumprimento dos objetivos, foram realizados sequenciamentos de bibliotecas de RNA total, o que gerou quantidades muito grandes de novos dados e possibilitou uma análise mais confiável do perfil de expressão de miRNAs de cana de açúcar sob seca.

Esta seção é apresentada na forma do manuscrito que será enviado para publicação, enquanto a apreciação das duas estratégias de uma forma geral encontra-se na próxima parte IV.

1 **Sugarcane miRNA Profile under Drought Stress using High-throughput**
2 **Sequencing.**

3

4 Raphael Mattos¹, Andrea Akemi Hoshino¹, Agustina Gentile¹, Kevin Begcy Padilla¹,
5 Thaís Ferreira¹, Monalisa Sampaio², Tercílio Calsa Jr. ³, Rejane Mansur Nogueira⁴,
6 Laurício Endres⁵, Marcelo Menossi^{1,*}

7

8 ¹ Laboratório de Genoma Funcional, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes,
9 Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo,
10 Brazil.

11

12 ² Departamento de Biotecnologia Vegetal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade
13 Federal de São Carlos. Araras, São Paulo, Brazil

14

15 ³ Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de
16 Pernambuco. Recife, Pernambuco, Brazil.

17

18 ⁴ Laboratório de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, Universidade Federal
19 Rural de Pernambuco. Recife, Pernambuco, Brazil.

20

21 ⁵ Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo, Alagoas,
22 Brazil.

23

24 **Data to inform online:**

25 **Short title:** Sugarcane miRNA profile under drought.

26

27 **Funding:** This study was funded by Brazilian foment institutions: FINEP,
28 FAPESP, CNPq and CAPES. The funders had no role in study design, data
29 collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

30

31 **Competing interests:** The authors have declared that no competing interests
32 exist.

33

34 **Author Contributions**

35 RM, MS, TC, RMN, LE and MM conceived and designed the experiments. RM,
36 AAH, AG, KBP and TF acquired and analyzed the data. RM, AAH, AG and MM
37 wrote the manuscript. All authors approved the published version.

38

38 **Abstract**

39

40 *Background:* Sugarcane (*Saccharum* spp.) is the most promising crop for
41 renewable energy. Among the diverse stresses that affect plant productivity,
42 drought stress is one of the most important and sugarcane is moderately
43 susceptible to water deficit. Recently, microRNA mediated post-transcriptional
44 regulation has been described as an important and decisive component in
45 vegetal development and stress resistance modulation. The role miRNA in
46 sugarcane responses to drought is not known so far.

47 *Methodology/Main Findings:* Two sugarcane varieties differing in drought
48 tolerance were cultivated in the field with and without irrigation. By using small
49 RNA deep-sequencing we were able to identify 34 conserved miRNAs families
50 of which were differentially expressed due to drought. Seven of those were
51 differentially expressed in both cultivars. Out of 34 putative sugarcane miRNA
52 families, 9 had their precursors predicted. Four miRNAs, sof-mir160, sof-
53 mir164, sof-mir172 and sof-mir528, had their expression evaluated by qRT-
54 PCR.

55 *Conclusions/Significance:* Several miRNAs were identified as differentially
56 expressed in sugarcane under drought stress. Nine had their precursor
57 predicted and should be new sugarcane miRNA. All of this data will help to
58 understand the role of miRNAs in the complex regulation of drought stress in
59 sugarcane and will assist in the essential knowledge to develop new sugarcane
60 varieties tolerant to drought stress.

61

62

62 Introduction

63

64 Sugarcane (*Saccharum* spp.) is one of the most relevant crop in the world. It is
65 an efficient source of sugar and ethanol, the latter being increasingly
66 acknowledged as the most promising energy source substitute for oil. Apart
67 from being very productive, it is largely affected by biotic and abiotic stresses,
68 like other plants, which leads to yield losses [1]. Drought stress is one of the
69 most important stresses that affect crops in many areas in the world. Under
70 severe conditions, drought can produce irreversible alterations that could cause
71 plants death. Among the effects that can occur in sugarcane, we can mention
72 inhibition of root germination and hence, of the nutrient absorption; reduction in
73 leaf and stalk elongation and in some varieties, rolling of the leaf causing a
74 reduction in light absorption and thus, reducing the photosynthesis [2].

75

76 MicroRNAs are an extensive family of small RNAs with a unique biogenesis [3].
77 They are small (19-24 nt) endogenous single-stranded non-coding RNA
78 molecules that hybridize to target mRNA in order to direct site-specific cleavage
79 or translational repression [4,5]. MicroRNAs have been described as regulatory
80 non-coding RNAs in plants and animals [4,6]. In plants like *Arabidopsis*,
81 *Brachypodium*, rice and maize, among others, several studies have been able
82 to describe miRNAs genes as well as their targets in a wide variety of tissues,
83 developmental stages and treatment conditions [7,8,9,10,11,12,13].

84

85 Because of their ability to regulate gene expression, many studies have been
86 focused on miRNAs. Plants miRNAs are often identical across large
87 evolutionary distances [14,15] and are highly complementary to their targets,
88 which helps in their identification through bioinformatics [10,16,17]. Many
89 predicted miRNA target genes encode regulatory proteins, suggesting that they
90 function as important regulators [6]. In *Arabidopsis*, 68% of the predicted
91 conserved targets encode transcription factors that appeared to be involved in
92 developmental patterning or stem cell identity [18]. The same was reported in
93 *Brachypodium distachyon*, where the majority of the predicted target genes
94 encode transcription factors regulating plant development, morphology and

105 flowering time [11]. Some reports revealed the miRNA involvement on gene
106 regulation under drought stress in rice [19] and maize [8]. Because of the
107 differences found between miRNAs of animals and plant, in biogenesis, targets
108 and mode of repression, it has been suggested that they originated
109 independently in each kingdom [3]. However, recent observations in the
110 unicellular green algae *Chlamydomonas reinhardtii*, support a more complex
111 evolution [20,21].

112

113 MicroRNAs expression studies were greatly facilitated by the improvement of
114 large-scale sequencing technologies that have been used in many studies
115 [12,22,23,24,25]. The Solexa technique allows the parallel sequencing of
116 millions of 36 bases-long fragments in a robust way, low price and high
117 performance [26,27]. The use of this methodology permits to infer the sample
118 expression profile by the digital gene expression tag profiling (DGE). It is
119 assumed that the number of times that a particular sequence is observed in a
120 cDNA sequencing library indicates the amount of that transcript in the sample.
121 Through basic statistics tests, it is possible to compare the expression profile of
122 two samples. Recently, Hoen et al. [28] obtained evidences that DGE detect
123 more expression differences, with less false positives, than quantitative real
124 time and microarrays. Up to now, the greater part of known plant miRNA
125 sequences belong to *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* and *Populus*
126 *trichocarpa*, because of their available genome. In sugarcane, one of the most
127 important tropical crops, only 16 miRNAs sequences were registered at
128 miRBase (<http://www.mirbase.org>) to this date. Moreover, there is no
information of the miRNAs expressed under a stress situation in this plant. In
this work, two sugarcane field-grown cultivars showing different responses to
water shortage were analyzed. The differentially expressed microRNAs were
identified and some were validated by qRT-PCR, while some miR targets were
predicted *in silico*.

129

130

131 **Material and methods**

132

133 *Plant samples*

129 Sugarcane cultivars RB867515 (known as presenting high tolerance to drought)
130 and RB855536 (lower drought tolerance) were field-grown in Campo Alegre
131 (Alagoas, Brazil, 9°45'32" S, 36°13'09" W). Leaf tissue was collected in
132 quadruplicates after 7 months from irrigated and drought stressed plants. The
133 samples were fast frozen and maintained at -80°C. Two replicates were
134 combined and used for Solexa sequencing, while four were used in qRT-PCR
135 validation.

136

137 *Leaf total RNA extraction*

138 Total RNA was isolated using the miRVana miRNA isolation kit (Ambion, USA)
139 according to manufacturer's protocol, with minor modifications. Briefly, 10
140 volumes of Lysis/Binding buffer per leaf macerate tissue mass were added into
141 a tube and mixed. One volume of miRNA homogenate additive was added to
142 the tissue lysate and mixed by vortexing. After 10 minutes on ice, 10 volume of
143 acid-phenol:chloroform was added and mixed gently. The samples were then
144 centrifuged 7 minutes at 10,000 g at room temperature to separate the aqueous
145 and organic phases. The aqueous phase was removed carefully and transferred
146 to a new tube. A 1.25 volume of absolute ethanol was added to the aqueous
147 phase and this mixture was placed onto the filter cartridge. Samples were
148 centrifuged 15 seconds at 10000 g to pass the mixture through the filter. Then,
149 successive washings were done. The filter was then transferred to a new tube
150 and the RNA was eluted in 80 µL of pre-heated nuclease-free water. Total RNA
151 samples were store at -80°C for later use.

152

153 *Small RNA Sequencing*

154 The cDNA library synthesis and sequencing were done at BGI (Beijing Genomic
155 Institute, Tai Po, Hong Kong), using the Solexa platform. Briefly, total RNA
156 samples received at the company were analyzed in a 2100 Bioanalyzer (Agilent,
157 USA) to check its integrity and quality. Before constructing the microRNAs
158 libraries, RNAs from 16 to 27 nucleotides were selected by polyacrilamide gel
159 electrophoresis, ligated with adaptors in both ends and the products were used
160 for cDNA synthesis. Then, they were PCR amplified and sequenced using the
161 Solexa technology.

162

163 *Bioinformatics analysis*

164 The initial analysis was done using SOAP (BGI Institute), to assembled reads.
165 The resulting clean reads were aligned against public databases of RNAs and
166 miRNAs: Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), RFAM
167 (<http://rfam.sanger.ac.uk>) and miRBase. To identify conserved miRNAs, all 20
168 to 22 mers tags that had a miRBase hit with up to 2 mismatches were selected
169 and grouped into 35 miRNA families. As described by [29], variants in the same
170 family with expression of less than 0.12% of the most expressed variant were
171 discarded along with any tag with less than 4 occurrences. The expression
172 profile analysis of each library was based on the *p-value* as proposed by Audic
173 and Claverie [30], using IDEG6 web tool [31].

174 To identify sugarcane miRNA precursors, an initial dataset was obtained by
175 using *blastn-short* to look for perfectly identical hits within the SoGI
176 (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi>) and SUCEST [32] databases. In a next
177 step, to identify the secondary structure of newly found miRNA precursors, in-
178 house Biopython [33] based scripts were written to apply filtering criteria to
179 candidates obtained using miRcheck [7], PatScan [34] and RNAfold [35]. The
180 MFEI value must be higher than 0.84, and miRcheck was used as
181 recommended by the author, except for a 600 nt “genomic region” size, instead
182 of 700.

183 Targets of almost all identified miRNA were predicted by aligning putative
184 sugarcane miRNA to SoGI database using *blastn-short* and analyzing the
185 results by biological criteria refined from numerous studies [17,36,37,38] using
186 in-house tools. Mismatches and single-base bulges scored 1 point and G:U
187 wobble pairs scored 0.5. If those occurred between bases 2 and 8, scores were
188 doubled. Mismatches between bases 9 and 12 were not allowed. Target
189 candidates were considered valid when expectation was equal or less than 4.0.

190

191 *Stem-loop reverse transcription and qRT-PCR validation*

192 RT-loop primers (loop-RT), forward specific PCR primers (loop-FW) and
193 reverse universal primers were designed following Chen et al. [39] (Table 1) for
194 reverse transcription and PCR amplification of sugarcane miRNAs. Reverse
195 transcriptase reactions were performed as described by Varkonyi-Gasic et al.
196 [40]. Each reaction contained 2.5 µg of total DNA-free RNA, 1 µL of RT-loop

197 primer (1 μ M), 1 μ L oligo d(T)₁₇VN (50 μ M) and 1 μ L of dNTPs mix (10 μ M). The
198 reaction was incubated for 10 minutes at 65°C and then laid on ice for 2
199 minutes. Subsequently, First Strand Buffer, DTT, RNaseOut and Superscript III
200 enzyme (Life technologies, USA) were added. This reaction was incubated in a
201 VerityTM Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA) for 30 minutes at 16°C,
202 followed by 60 cycles of 30°C for 30 seconds, 42°C for 30 seconds and 50°C
203 for 1 second. Finally, the reaction was incubated 5 minutes at 85°C for the
204 enzyme inactivation.

205 Real time PCR was performed to analyze the expression of sugarcane miRNAs.
206 The reactions were performed using the SYBRGreen PCR Master Mix (Applied
207 Biosystems, USA) on 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, USA).
208 Each PCR reaction of 18 μ L included: 2 μ L of cDNA, 10 μ L SYBRGreen Master
209 Mix (1X), 1 μ L of forward specific primer (10 μ M), 1 μ L of reverse universal
210 primer (10 μ M) (Table 1) and water. A polyubiquitin gene [41] was used as
211 reference (Table 1). The reactions were performed at 95°C for 10 minutes,
212 followed by 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute with a final
213 dissociation curve analysis. All reactions were run in triplicate and with four
214 biological replicates.

215 The real time PCR data analysis was done considering the reaction efficiencies
216 to calculate the miRNA fold-changes and using the web-based system QPCR
217 [42].

218

219

220 **Results**

221

222 *Identification of evolutionarily conserved sugarcane miRNAs*

223 Several miRNAs from *Saccharum* spp. were identified by high-throughput
224 Solexa sequencing and compared to miRBase public miRNA database. Total
225 RNA samples were obtained from mature leaves of two different sugarcane
226 varieties, RB867515 and RB855536, cultivated in the field, under irrigation or
227 not. These four cDNAs libraries yielded between 8 to 12 million clean reads
228 each (Table 2), and more than 40 million reads in total. Good quality reads
229 between 16 and 27 bases were analyzed. In both varieties and under both
230 conditions (irrigated and stressed), the most abundant sRNAs were from 21 and

231 24-nt classes, miRNA and siRNA, respectively (Figure 1). This pattern was also
232 observed in sequencing analysis in other plant species [22,25,43].
233 After annotation of unique tags using RFam and Genbank RNA databases,
234 remaining tags were compared to monocot miRNAs in miRBase, which resulted
235 in 34 families, some of them with several variant sequences. After cutting of
236 extremely low expressed tags and variants, we found 26 conserved miRNA
237 families in sugarcane (Table S1).

238

239 *Differential expression of sugarcane miRNA under drought stress*

240 Considering a $p\text{-value} < 0.05$ and fold change ≥ 2 , we have identified 20
241 differentially expressed miRNA families (Table 3). The drought tolerant cultivar
242 RB867515 had 18 microRNAs differentially expressed between treatments (Ti x
243 Ts), while the drought stress susceptible RB855536 presented 9 miRNAs (Si x
244 Ss). Both cultivars share 7 miRNAs differentially expressed in this comparison.
245 Among these, four were induced or repressed in both cultivars, while the other
246 three had opposite pattern. Also, it was found that 14 microRNAs were down
247 regulated by drought in the tolerant variety, while 6 out of 9 were up regulated in
248 the susceptible one.

249

250 *In silico precursor and target prediction*

251 The whole set of miRNA sequences was mapped onto SoGI and SUCST
252 databases in order to identify their precursors. In total, precursors for 9 miRNAs
253 were identified (Table 4). From those, 6 belong to the conserved families found
254 in sugarcane (Table S1), but there were not differentially expressed under
255 drought. It was found the precursor only for three miRNAs differentially
256 expressed (Sof miR437, Sof miR444 and Sof miR528, Table 3). Interestingly,
257 these three miRNAs were already described as monocot exclusive and there
258 were differentially expressed under drought in this field experiment. Also
259 miR528 was described as differentially expressed under drought in wheat [44].
260 MicroRNA sequences were also used to search for their targets. Almost all of
261 the differentially expressed miRNAs had target candidates in SoGI database
262 (Table 3).

263 Among the targets, there are transcription factors (mir164, miR171, miR444,
264 etc), growth-regulating factors (miR396) and proteins associated with flower

265 development (miR172) (Table 3). The targets had homologous protein products
266 in diverse plant species, most commonly in rice and maize.

267

268 *Sequencing results and qRT-PCR validation*

269 qRT-PCR was used to validate the expression of some sugarcane microRNAs
270 in control and drought stressed leaves from both varieties (RB867515 and
271 RB855536). The expression profile was evaluated for the following miRNAs:
272 sof-miR160, sof-miR164, sof-miR172 and sof-miR528. The sequencing results
273 (Figure 2) showed that sof-miR160 was significantly more expressed under
274 drought stress than in control situation only in the susceptible cultivar
275 (RB855536). On the other hand, sof-miR164 and sof-miR528 were more
276 expressed in the drought treatment in the tolerant cultivar. From the list of
277 miRNAs differentially expressed under drought in the tolerant cultivar, we also
278 chose sof-miR172 that was more expressed in control situation.

279 As shown in Figure 3, sof-miR160, sof-miR164 miRNAs had their sequencing
280 expression pattern confirmed by qRT-PCR. For sof-miR528, only the pattern of
281 the tolerant cultivar was confirmed, because in the susceptible cultivar, more
282 expression was observed in the control condition. The sof-miR172 qRT-PCR
283 expression pattern was different from that observed in the sequencing. This
284 miRNA was expected to be more expressed in control treatment but through
285 qRT-PCR they were more expressed under drought.

286

287 **Discussion**

288

289 There are many recent reports confirming the identification of microRNAs in
290 different plants and some also describe miRNAs differentially expressed under
291 stress [8,11,22,25,43,45,46,47,48,49]. Although some sugarcane miRNAs have
292 already been registered at miRBase, this is the first report that associates stress
293 and microRNAs identification in sugarcane.

294 During the development of SUCEST project, 43.141 transcripts of sugarcane
295 (SAS, Sugarcane Assembled Sequences) were generated; from those, 30% did
296 not present gene or protein sequence homology previously identified in other
297 organisms [32]. Many of those sequences are specific in sugarcane and could
298 be involved in the post-transcriptional regulation of other genes. Approximately,

299 1% of the genes that encodes proteins had one microRNA associated with its
300 regulation [6]. Consequently, we could expect about 430 sequences in
301 sugarcane. Nowadays, there are only 16 sugarcane microRNA sequences
302 predicted by bioinformatics in the miRBase. In this work we have described 20
303 sugarcane miRNAs differentially expressed under drought stress (Table 3) with
304 precursors identified in SoGI databases (Table 4). Because miRNA expression
305 could be tissue, age or development stage specific, it is expected that the
306 number of sugarcane miRNAs rises when other tissues were analyzed.

307

308 Many new microRNAs, not conserved among the species, have been identified
309 along with their targets, which include genes associated with diverse metabolic
310 pathways and cellular processes related with the development of resistance to
311 abiotic stresses [50,51,52]. Using *Populus trichocarpa* as a model, Lu et al. [53]
312 confirmed predicted targets as genes related with development and/or stress,
313 and with putative associate functions with cell wall metabolites, important in the
314 regulation of wood development in trees. Although some microRNAs present
315 conserved sequences, most of them exhibit expression profile species-specific
316 during the development, suggesting that conserved microRNAs could present
317 different regulatory roles in each species.

318

319 Sugarcane miRNA targets were predicted by psRNAtarget, recently used in a
320 similar study [25]. From the whole set of mapped miRNA sequences, it was
321 predicted target genes for almost all the 26 miRNAs families found in SoGI
322 database (data not shown). Among all predicted miRNA targets in SoGI, the
323 majority were transcription factors, as already described for other organisms
324 [10].

325 From the 20 drought differential expressed miRNAs identified in this work, we
326 have found target genes to 19 in SoGI database (Table 3). Among these 19
327 miRNAs, there are conserved miRNAs, like miR528, known also to be related to
328 drought stress response in wheat plant [44]; and miR171, miR172, miR319 and
329 miR396 in rice [47].

330

331 Sunkar et al. [50] identified 26 new microRNAs sequences from Arabidopsis
332 exposed to water deficit, salinity, cold and ABA that were not conserved in rice,

333 suggesting the existence of others microRNAs that could be critic under specific
334 processes. In Arabidopsis, three microRNAs were induced under drought. One
335 of them, miR393, also induced by cold and ABA, had as target genes that
336 encodes proteins from the ubiquitin system. In sugarcane, sof-mir393 was
337 significantly repressed in the tolerant cultivar under drought. Zhou et al. [47]
338 also observed this opposite expression pattern between Arabidopsis and rice in
339 nine out of 30 differentially expressed miRNAs under drought, in spite of having
340 similar target genes.

341

342 The sof-miR160 presented induced expression in the susceptible cultivar under
343 drought stress. The homolog of this miRNA in maize was repressed by drought
344 [54] and induced by salt stress [55]. These same authors identified that the
345 probable targets of mir160 are genes that codified the ribosomal protein S16
346 and the transcription factor ARR11, involved in the signal transduction of
347 cytokinine [56]. Although we could not find a link with the S16 protein and stress
348 in plants, the hormone cytokinine could have an important role in drought
349 tolerance [57,58]. The authors produced transgenic tobacco plants over
350 expressing the isopentenyltransferase gene that controls a key stage of the
351 cytokinine pathway. Those plants presented high levels of cytokinine that finally
352 increase drought tolerance. This better performance is associated to an
353 increase in the photorespiration, protecting the photosynthesis. The expression
354 profile of sof-mir160 observed in sugarcane, under drought stress, indicated
355 that the expression profile depends on the variety and treatment and, although it
356 might be affected by agents other than drought, it could be an important
357 difference between the two varieties in dealing with water deficit. The regulation
358 of the mir160 seems quite complex and more studies are necessary.

359

360 Coruzzi et al. [59] observed that the mir167 responded to deficient conditions of
361 nitrate and that the super expression of the mir167 increase the lateral roots,
362 expanding the area explored by the plant. With this, the metabolic efficiency
363 was higher, with a major absorption of nutrients, high growth rate and
364 productivity. In sugarcane, sof-mir167 was not statistically differentially
365 expressed under drought in sequencing but by qRT-PCR it was induced in both
366 varieties under drought stress (data not shown), indicating that this miRNAs is

367 important for the drought response and that it is an excellent candidate for
368 future studies in sugarcane biotechnology. This miRNA qRT-PCR results could
369 also suggest that there are some differentially expressed miRNA that were
370 excluded from the analysis and could be interesting, but since we have a lack of
371 parameters in literature indicating the best criteria to categorize the miRNA. Xin
372 et al. [43] described $p < 0.05$ as the unique criterion to identify heat and
373 powdery mildew infection responsive miRNAs in wheat.

374

375 The mir156 regulates transcription factors like Squamosa Promoter Binding
376 Protein Like (SPL), involved in the blossom and the vegetal development
377 [60,61]. Hsieh et al. [62] observed that the mir156 is induced by deficiency of Pi,
378 N and K in Arabidopsis roots, but its expression is not altered in leaf submitted
379 to those or others stresses. The exact role of this microRNA in the response to
380 stress is still not defined, but the data found in a recent patent demonstrated
381 that the super expression of the mir156 in transgenic Arabidopsis plants
382 increase the ramification of the shoot, increasing also the plant biomass [63].
383 On the other hand, Zhou et al. [47] observed mir156 repressed in rice under
384 drought, suggesting that this miRNA could have diverse expression pattern
385 among species. This hypothesis is supported by Jiang et al [64] that observed
386 different miRNA expression pattern between Arabidopsis and rice. In this study,
387 sof-mir156 was statistically differentially expressed only between sugarcane
388 cultivars in control condition, indicating that this miRNA is not related to drought
389 stress response but may be important for growing and development of
390 RB867515, that is more productive than RB855536 (Endres et al., data not
391 published). Otherwise, sof-mir157 was differentially expressed only in drought
392 treatment between cultivars, indicating that it may have conserved its function in
393 stress response. This miRNA also seem to be an interesting candidate for
394 further functional analyses.

395

396 Three of the differentially expressed miRNAs in our experiments, miR437,
397 miR444 and miR528 are monocot specific [48,65]. The first one targets a Cullin-
398 like transcript in SoGI database. In Arabidopsis, the AXR6 gene encodes CUL1,
399 a cullin-like gene required for auxin signaling in early development [66]. It's an
400 important component of the SCF E3 protein complex, which is responsible for

401 degradation of Aux/IAA nuclear proteins, which in turn repress ARF
402 transcription factors [67]. Since miR437 was repressed in RB867515 under
403 drought, it is possible that cullin-like genes with similar role in sugarcane were
404 needed in order to produce SCF complexes to degrade Aux/IAA and allow
405 greater activity of ARF transcription factors. Moreover, Binder et al. [68] describe
406 a role in the ethylene signaling pathway for proteins EBF1 and EBF2,
407 components of the SCF E3 complex.

408

409 The predicted target of miR444 in sugarcane ESTs is homolog to a MADS-box
410 transcription factor in rice. This class of genes is very diverse and includes
411 APETALA-like and SEPALLATA-like genes in maize and wheat, apart from
412 presenting different expression patterns over development stages and tissues
413 [69,70]. In spite of being an interesting miRNA, a great deal of further
414 investigation is necessary before it is possible to interpret its action. As with
415 miR437, the RB867515 tolerant cultivar expresses more miR444 under control
416 than RB855536, but represses it significantly under treatment.

417

418 Finally, miR528, also described as monocot exclusive, is less abundant in
419 RB867515 in control and is up-regulated under drought, but in this condition
420 although significantly different in RB855536, their difference is less than the
421 two-fold cutoff. The qRT-PCR results validate the sequencing result within the
422 tolerant cultivar. Its target in sugarcane seems to be a UBX domain-containing
423 protein, a wide class of proteins conserved between kingdoms. There is not
424 much information about functional aspects of this kind of protein in plants, but in
425 Arabidopsis, PUX1 has been described as a regulator of p97/CDC48 molecular
426 chaperone with ATPase activity [71]. The loss of function *pux1* mutant showed
427 accelerated growth relative to wild-type plants. This could suggest a growth
428 control related role for miR528.

429

430 The future perspective is that the miRNAs identified could be characterized
431 together with its targets, generating the essential knowledge to develop new
432 sugarcane varieties tolerant to drought stress. These data are of great value
433 because they are the first in sugarcane under a particular stress and in field-
434 grown cultivars. With the probable known sequences it could be possible to

435 predict targets more accurately by bioinformatics and the precursors through
436 other techniques, such as RACE. Finding the precursor of a certain miRNA of
437 interest is central for gene characterization and allows the determination of the
438 promoter associate. The targets found in this study are in agreement with those
439 already published, reinforcing the good quality of the data.

440

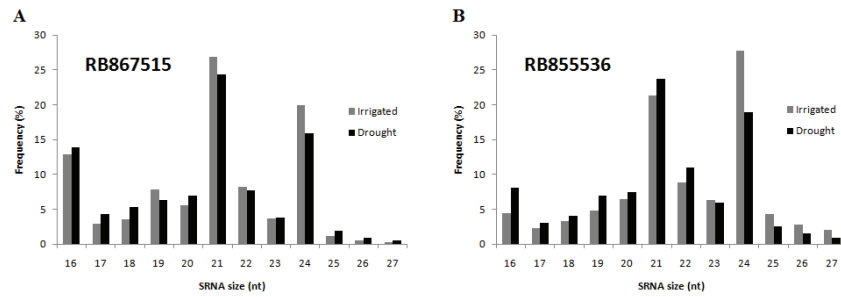
441

442 **Acknowledgements**

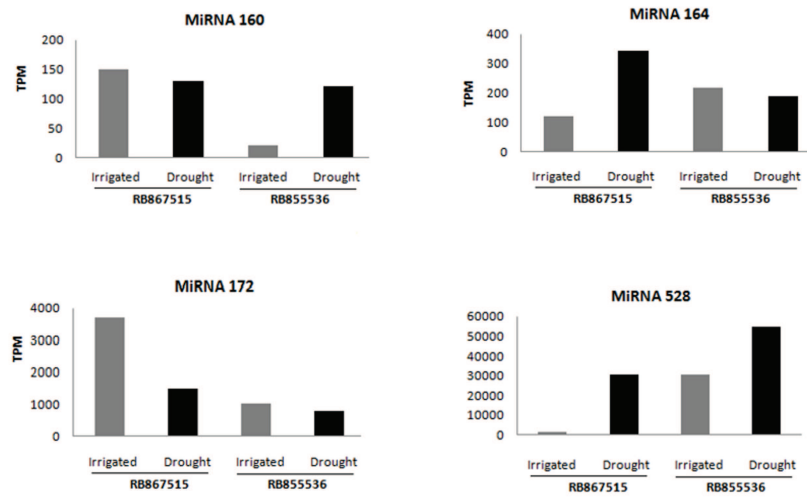
443 We would like to thank our RIDESA partners, especially Dr. Laurício Endres, for
444 the hard work in the field-grown experiments and Dr. Renato Vicentini for
445 helping with bioinformatic analysis.

446

446 **Figure 1.** Size distribution of small RNA (sRNA) sequences in sugarcane.
 447 Plants of cultivars RB867515 (A) and RB855536 (B) were field-grown for 7
 448 months in two conditions: irrigated (grey bars) and drought stressed (black
 449 bars). RB867515 is known as more tolerant to drought than RB855536.
 450



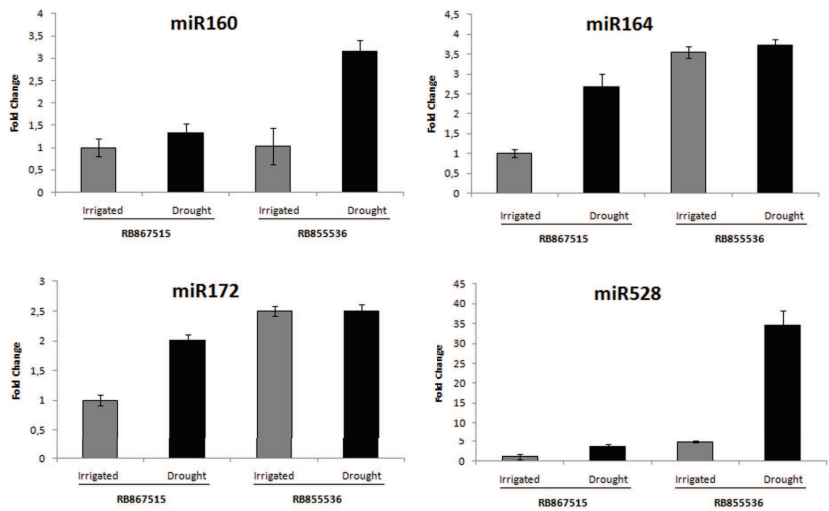
452 **Figure 2.** Expression profile based on sequencing data of 10 sugarcane
 453 microRNAs. The value is expressed in number of transcripts per million (TPM)
 454 for both condition: irrigated (control, grey bars) and drought stressed (black
 455 bars) and for both varieties: RB867515 (more tolerant to drought) and
 456 RB855536 (more susceptible). Each sample was a mix of two replicates.
 457



458

459

459 **Figure 3.** qRT-PCR expression profile for 4 sugarcane microRNAs. RB867515
 460 and RB855536 leaves were used to analyze the miRNA expression, under
 461 control (grey bars) and drought stress conditions (black bars), in 7 month-old
 462 field-grown plants. RB867515 irrigated was used as reference sample to
 463 calculate the fold change. The fold change value and standard deviation is the
 464 mean of four biological replicates.
 465



466
 467
 468

468 **Table 1.** qRT-PCR primers used in sugarcane miRNAs expression analysis.

Primer name	Sequence (5'-3')	Nt	T _m (°C)
loop-RT160	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGGCACTGGA TACGACAGGCAT	50	99
loop-FW160	GGCTGCCTGGCTCCCTGT	18	61.6
loop-RT172	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGGCACTGGA TACGACTGCAGC	50	99
loop-FW172	GCGCCGGAATCTTGATGAT	19	56
loop-RT164	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGGCACTGGA TACGACTGCACG	50	99
loop-FW164	GCGTGGAGAAGCAGGGCA	18	61
loop-RT528	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGGCACTGGA TACGACCTCCTC	50	99
loop-FW528	CGTGAAGGGGCATGCA	17	59
PUB-FW	CCGGTCCTTTAAACCAACTCAGT	23	57
PUB-RV	CCCTCTGGTGTAACCTCCATTG	22	57.3
reverse universal	GTGCAGGGTCCGAGGT	16	58.4

469

470 RT: primer loop for reverse transcription, FW: forward primer for real time PCR, reverse
 471 universal: reverse primer for real time PCR, PUB: polyubiquitin gene primer, Nt:
 472 number of nucleotides. The numbers in each primer name indicate the corresponding
 473 number of the miRNA in sugarcane.
 474

474 **Table 2.** Small RNA deep-sequencing results for sugarcane leaves from
 475 RB867515 (higher tolerant to drought - T) and RB855536 (lower tolerant to
 476 drought - S) varieties under irrigation (I) and non irrigation (S) conditions.
 477

Category	TI				TS			
	Unique RNAs	Percent (%)	Total RNAs	Percent (%)	Unique RNAs	Percent (%)	Total RNAs	Percent (%)
miRNA	33,295	0.86	2,568,341	21.04	15,074	0.71	1,547,690	20.47
rRNA	57,826	1.49	690,977	5.66	80,838	3.8	1,307,606	17.29
siRNA	99,469	2.57	640,673	5.24	31,807	1.49	208,823	2.76
snRNA	2,778	0.07	13,047	0.1	2,893	0.14	14,372	0.19
snoRNA	1,457	0.04	4,727	0.04	1,05	0.05	3,298	0.04
tRNA	15,783	0.41	1,058,986	8.67	17,416	0.82	479,527	6.34
Unannotated	3,680,105	94.55	7,230,626	59.23	1,978,922	92.99	4,000,025	52.9
Total small RNAs	3,870,713	100.00	12,207,377	100.00	2,128,000	100.00	7,561,341	100.00

Category	SI				SS			
	Unique RNAs	Percent (%)	Total RNAs	Percent (%)	Unique RNAs	Percent (%)	Total RNAs	Percent (%)
miRNA	15,663	0.52	1,294,640	12.98	19,966	0.72	1,853,916	17.76
rRNA	108,411	3.57	1,994,571	20.00	83,009	2.99	1,504,192	14.41
siRNA	55,071	1.81	402,188	4.03	44,402	1.6	255,345	2.45
snRNA	4,955	0.16	43,655	0.44	3,797	0.14	21,84	0.21
snoRNA	2,184	0.07	10,697	0.11	2,624	0.09	18,403	0.18
tRNA	23,831	0.78	766,089	7.68	19,327	0.7	547,433	5.25
Unannotated	2,825,979	93.08	5,461,047	54.76	2,605,783	93.77	6,235,247	59.75
Total small RNAs	3,036,094	100.00	9,972,887	100.00	2,778,908	100.00	10,436,376	100.00

478

479 **Table 3.** Conserved sugarcane microRNAs differentially expressed under drought and their targets.

480

miRNA	Mature Sequence	Nt	RB867515	RB855536	Predicted Target	Target homolog/similar; species
mir160	TGCTTGCTCCCTGTATGCCA	21			CA184830	Unknown
mir162	TCGATAAACCTCTGCATCCAG	21			CA157043	Ulp1 protease family; Osa
mir164	TGGAGAAGCAGGGCACGTGCA	21			CA293780	NAC transcription factor; Hvu
mir171	TGATTGAGCCGTGCCAATATC	21			TC151967	Scarecrow-like (SCL1) TF; Osa
mir172	AGAATCTTGATGATGTGCAT	21			CA102399	Nitrilase 1; Zma
mir319	TTGGACTGAAGGGTGCTCCCT	21			TC153622	Unknown
mir393	CTCCAAAGGGATCGCATTGAT	21			TC120009	Unknown
mir394	TTGGCATTCTGTCCACCTCC	20			TC140342	Unknown
mir396	TCCACAGGCTTTCTTGAAGT	21			TC137697	Growth-regulating factor 8; Osa
mir397	TCATTGACTGCAGCGTTGATG	21			TC142804	Laccase-12/13 precursor; Osa
mir398	TGTGTTCTCAGGTCGCCCC	20			TC130960	Silencing group B protein; Zma
mir399	TGCCAAAGGAGAGTTGCCCTG	21			TC154035	Unknown
mir437	TCAAAGTTAGAGAAGTTTGAC	21			TC153776	Unknown
mir444	TGCAGTTGCTGTCTCAAGCTT	21			TC153894	MADS-box transcription factor 57 (partial); Osa
mir528	TGGAAGGGGCATGCAGAGGAG	21			TC113980	Vacuolar sorting protein 9 protein; Osa
mir530	TGCATTGACCTGCACCTCT	21			TC150233	U2 snRNP auxiliary factor, large sub., splicing factor family; Osa
mir827	TTAGATGACCATCAGCAAACA	21			CA186401	SPX (SYG1/Pho81/XPR1) domain-containing protein; Osa
mir1318	TCAGGAAAGATGACACCGACA	21			TC154195	Unknown
mir1432	TCAGGAAAGATGACACCGACA	21			Unknown	Unknown
mir1436	AACATTACGGGACGGAGGGAG	21			TC136936	Unknown

Nt: number of nucleotides of the mature miRNA; Red wells indicate statistically ($p < 0.05$) down-regulated miRNAs and green wells indicate statistically ($p < 0.05$) up-regulated miRNAs under drought. * indicates miRNAs differentially expressed in both growth conditions: greenhouse and field; Conserved miRNA sequences showed up to 2 mismatches to miRBase database.

Osa: *Oriza sativa*, Hvu: *Hordeum vulgare*, Zma: *Zea mays*

481

481 **Table 4.** Precursors of microRNAs found in RB867515 and RB855536
 482 sugarcane varieties under drought stress.

483

miRNA	pre-miR	pre-miR length	pre-miR MFEI
sof-miR156	TC152883	178	-1,66
sof-miR159	TC119061	460	-2,73
sof-miR166	TC144774	226	-1,77
sof-miR167	TC123947	306	-2,59
sof-miR168	TC137276	142	-0,98
sof-miR437	TC132027	336	-3,07
sof-miR444	TC150124	200	-2,2
sof-miR444	TC152641	200	-2,1
sof-miR528	CA290495	192	-1,41
sof-miR1439	CA198902	306	-2,97

484

485 The name of the pre-miR cluster is based on the SOGI database; Precursor length is in
 486 number of nucleotides; MFEI: minimal-folding free energy index.

487

487 **Table S1.** The 26 miRNAs families founds between the 2 varieties of sugarcane
488 under drought stress.

miRNA	mature sequence	miR length
miR156	TTGACAGAAGAGAGTGAGCAC	21
miR159	TTTGGATTGAAGGGAGCTCTG	21
miR166	TCTCGGACCAGGCTTCATTCC	21
miR167	TGAAGCTGCCAGCATGATCTGA	22
miR168	TCGCTTGGTGACATCGGGAC	21
miR1439	ATTTGGAACGGAGGGAGTATT	21
miR160	TGCCTGGCTCCCTGTATGCCA	21
miR162	TCGATAAACCTCTGCATCCAG	21
miR164	TGGAGAAGCAGGGCACGTGCA	21
miR171	TGATTGAGCCGTGCCAATATC	21
miR172	AGAATCTTGATGATGCTGCAT	21
miR319	TTGGACTGAAGGGTGCTCCCT	21
miR393	CTCCAAAGGGATCGCATTGAT	21
miR394	TTGGCATTCTGTCCACCTCC	20
miR396	TCCACAGGCTTTCTTGAAGT	21
miR397	TCATTGACTGCAGCGTTGATG	21
miR398	TGTGTTCTCAGGTCGCCCC	20
miR399	TGCCAAAGGAGAGTTGCCCTG	21
miR437	TCAAAGTTAGAGAAGTTTGAC	21
miR444	TGCAGTTGCTGTCTCAAGCTT	21
miR528	TGGAAGGGGCATGCAGAGGAG	21
miR530	TGCATTTGCACCTGCACCTCT	21
miR827	TTAGATGACCATCAGCAAACA	21
miR1318	TCAGGAAAGATGACACCGACA	21
miR1432	TCAGGAAAGATGACACCGACA	21
miR1436	AACATTACGGGACGGAGGGAG	21

489

490 **References**

- 491 1. Agarwal PK, Agarwal P, Reddy MK, Sopory SK (2006) Role of DREB transcription
492 factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports* 25:
493 1263-1274.
- 494 2. Inman-Bamber NG, Smith DM (2005) Water relations in sugarcane and response to
495 water deficits. *Field Crops Research* 92: 185-202.
- 496 3. Axtell MJ (2008) Evolution of microRNAs and their targets: Are all microRNAs
497 biologically relevant? *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Regulatory*
498 *Mechanisms* 1779: 725-734.
- 499 4. Carrington JC, Ambros V (2003) Role of microRNAs in plant and animal
500 development. *Science* 301: 336-338.
- 501 5. Kidner C, Timmermans M (2006) In situ hybridization as a tool to study the role of
502 microRNAs in plant development. *Methods Mol Biol* 342: 159-179.
- 503 6. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*
504 116: 281-297.
- 505 7. Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004) Computational identification of plant
506 MicroRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular*
507 *Cell* 14: 787-799.
- 508 8. Zhang LF, Chia JM, Kumari S, Stein JC, Liu ZJ, et al. (2009) A Genome-Wide
509 Characterization of MicroRNA Genes in Maize. *Plos Genetics* 5: -.
- 510 9. Gustafson AM, Allen E, Givan S, Smith D, Carrington JC, et al. (2005) ASRP: the
511 Arabidopsis Small RNA Project Database. *Nucleic Acids Research* 33: D637-
512 640.
- 513 10. Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, et al. (2002) Prediction of
514 plant microRNA targets. *Cell* 110: 513-520.
- 515 11. Unver T, Budak H (2009) Conserved microRNAs and their targets in model grass
516 species *Brachypodium distachyon*. *Planta* 230: 659-669.
- 517 12. Zhang J, Xu Y, Huan Q, Chong K (2009) Deep sequencing of *Brachypodium* small
518 RNAs at the global genome level identifies microRNAs involved in cold stress
519 response. *Bmc Genomics* 10: 449.
- 520 13. Wu L, Zhang QQ, Zhou HY, Ni FR, Wu XY, et al. (2009) Rice MicroRNA Effector
521 Complexes and Targets. *Plant Cell* 21: 3421-3435.
- 522 14. Axtell MJ, Bartel DP (2005) Antiquity of microRNAs and their targets in land
523 plants. *Plant Cell* 17: 1658-1673.
- 524 15. Floyd SK, Bowman JL (2004) Gene regulation: ancient microRNA target sequences
525 in plants. *Nature* 428: 485-486.
- 526 16. Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP (2002) MicroRNAs
527 in plants. *Genes Dev* 16: 1616-1626.
- 528 17. Fahlgren N, Carrington JC (2010) miRNA Target Prediction in Plants. *Methods Mol*
529 *Biol* 592: 51-57.
- 530 18. Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B (2006) MicroRNAs and their regulatory
531 roles in plants. *Annual Review of Plant Biology* 57: 19-53.
- 532 19. Zhao BT, Liang RQ, Ge LF, Li W, Xiao HS, et al. (2007) Identification of drought-
533 induced microRNAs in rice. *Biochemical and Biophysical Research*
534 *Communications* 354: 585-590.
- 535 20. Molnar A, Schwach F, Studholme DJ, Thuenemann EC, Baulcombe DC (2007)
536 miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas*
537 *reinhardtii*. *Nature* 447: 1126-1129.

538 21. Zhao T, Li G, Mi S, Li S, Hannon GJ, et al. (2007) A complex system of small
539 RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genes Dev* 21:
540 1190-1203.

541 22. Pantaleo V, Szittyá G, Moxon S, Miozzi L, Moulton V, et al. (2010) Identification
542 of grapevine microRNAs and their targets using high-throughput sequencing
543 and degradome analysis. *Plant Journal* 62: 960-976.

544 23. Ruby JG, Jan C, Player C, Axtell MJ, Lee W, et al. (2006) Large-scale sequencing
545 reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C.*
546 *elegans*. *Cell* 127: 1193-1207.

547 24. Wei B, Cai T, Zhang RZ, Li AL, Huo NX, et al. (2009) Novel microRNAs
548 uncovered by deep sequencing of small RNA transcriptomes in bread wheat
549 (*Triticum aestivum* L.) and *Brachypodium distachyon* (L.) Beauv. *Functional &*
550 *Integrative Genomics* 9: 499-511.

551 25. Zhao CZ, Xia H, Frazier TP, Yao YY, Bi YP, et al. (2010) Deep sequencing
552 identifies novel and conserved microRNAs in peanuts (*Arachis hypogaea* L.).
553 *Bmc Plant Biology* 10: -.

554 26. Shendure J, Porreca GJ, Reppas NB, Lin X, McCutcheon JP, et al. (2005) Accurate
555 multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science* 309:
556 1728-1732.

557 27. Bentley DR (2006) Whole-genome re-sequencing. *Current Opinion in Genetics &*
558 *Development* 16: 545-552.

559 28. t Hoen PA, Ariyurek Y, Thygesen HH, Vreugdenhil E, Vossen RH, et al. (2008)
560 Deep sequencing-based expression analysis shows major advances in
561 robustness, resolution and inter-lab portability over five microarray platforms.
562 *Nucleic Acids Research* 36: e141.

563 29. Schreiber AW, Shi BJ, Huang CY, Langridge P, Baumann U (2011) Discovery of
564 barley miRNAs through deep sequencing of short reads. *Bmc Genomics* 12: -.

565 30. Audic S, Claverie JM (1997) The significance of digital gene expression profiles.
566 *Genome Research* 7: 986-995.

567 31. Romualdi C, Bortoluzzi S, D'Alessi F, Danieli GA (2003) IDEG6: a web tool for
568 detection of differentially expressed genes in multiple tag sampling experiments.
569 *Physiological Genomics* 12: 159-162.

570 32. Vettore AL, da Silva FR, Kemper EL, Arruda P (2001) The libraries that made
571 SUCEST. *Genetics and Molecular Biology* 24: 1-7.

572 33. Cock PJA, Antao T, Chang JT, Chapman BA, Cox CJ, et al. (2009) Biopython:
573 freely available Python tools for computational molecular biology and
574 bioinformatics. *Bioinformatics* 25: 1422-1423.

575 34. Pesole G, Liuni S, D'Souza M (2000) PatSearch: a pattern matcher software that
576 finds functional elements in nucleotide and protein sequences and assesses their
577 statistical significance. *Bioinformatics* 16: 439-450.

578 35. Hofacker IL (2003) Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids*
579 *Research* 31: 3429-3431.

580 36. Zhang BH, Pan XP, Wang QL, Cobb GP, Anderson TA (2006) Computational
581 identification of microRNAs and their targets. *Computational Biology and*
582 *Chemistry* 30: 395-407.

583 37. Bartel DP (2009) MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*
584 136: 215-233.

585 38. Kruger J, Rehmsmeier M (2006) RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast
586 and flexible. *Nucleic Acids Research* 34: W451-454.

- 587 39. Chen CF, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou ZH, Lee DH, et al. (2005) Real-time
588 quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*
589 33: e179.
- 590 40. Varkonyi-Gasic E, Wu RM, Wood M, Walton EF, Hellens RP (2007) Protocol: a
591 highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of
592 microRNAs. *Plant Methods* 3: 12.
- 593 41. Papini-Terzi FS, Rocha FR, Vencio RZN, Oliveira KC, Felix JD, et al. (2005)
594 Transcription profiling of signal transduction-related genes in sugarcane tissues.
595 *DNA Research* 12: 27-38.
- 596 42. Pabinger S, Thallinger GG, Snajder R, Eichhorn H, Rader R, et al. (2009) QPCR:
597 Application for real-time PCR data management and analysis. *Bmc*
598 *Bioinformatics* 10: 268.
- 599 43. Xin M, Wang Y, Yao Y, Xie C, Peng H, et al. (2010) Diverse set of microRNAs are
600 responsive to powdery mildew infection and heat stress in wheat (*Triticum*
601 *aestivum* L.). *Bmc Plant Biology* 10: 123.
- 602 44. Kantar M, Lucas SJ, Budak H (2011) miRNA expression patterns of *Triticum*
603 *dicoccoides* in response to shock drought stress. *Planta* 233: 471-484.
- 604 45. Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004) Computational identification of plant
605 microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular*
606 *Cell* 14: 787-799.
- 607 46. Jian XY, Zhang L, Li GL, Zhang L, Wang XJ, et al. (2010) Identification of novel
608 stress-regulated microRNAs from *Oryza sativa* L. *Genomics* 95: 47-55.
- 609 47. Zhou L, Liu Y, Liu Z, Kong D, Duan M, et al. (2010) Genome-wide identification
610 and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *Journal of*
611 *Experimental Botany* 61: 4157-4168.
- 612 48. Matts J, Jagadeeswaran G, Roe BA, Sunkar R (2010) Identification of microRNAs
613 and their targets in switchgrass, a model biofuel plant species. *Journal of Plant*
614 *Physiology* 167: 896-904.
- 615 49. Ruan MB, Zhao YT, Meng ZH, Wang XJ, Yang WC (2009) Conserved miRNA
616 analysis in *Gossypium hirsutum* through small RNA sequencing. *Genomics* 94:
617 263-268.
- 618 50. Sunkar R, Zhu JK (2004) Novel and stress-regulated microRNAs and other small
619 RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 2001-2019.
- 620 51. Llave C, Kasschau KD, Rector MA, Carrington JC (2002) Endogenous and
621 silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell* 14: 1605-1619.
- 622 52. Eckardt NA (2004) Small RNA on the move. *Plant Cell* 16: 1951-1954.
- 623 53. Lu S, Sun YH, Shi R, Clark C, Li L, et al. (2005) Novel and mechanical stress-
624 responsive MicroRNAs in *Populus trichocarpa* that are absent from *Arabidopsis*.
625 *Plant Cell* 17: 2186-2203.
- 626 54. Wei LY, Zhang DF, Xiang F, Zhang ZX (2009) DIFFERENTIALLY EXPRESSED
627 miRNAs POTENTIALLY INVOLVED IN THE REGULATION OF
628 DEFENSE MECHANISM TO DROUGHT STRESS IN MAIZE SEEDLINGS.
629 *International Journal of Plant Sciences* 170: 979-989.
- 630 55. Ding D, Zhang LF, Wang H, Liu ZJ, Zhang ZX, et al. (2009) Differential expression
631 of miRNAs in response to salt stress in maize roots. *Annals of Botany* 103: 29-
632 38.
- 633 56. Mason MG, Mathews DE, Argyros DA, Maxwell BB, Kieber JJ, et al. (2005)
634 Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in
635 *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 3007-3018.

- 636 57. Rivero RM, Kojima M, Gepstein A, Sakakibara H, Mittler R, et al. (2007) Delayed
637 leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant.
638 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of
639 America 104: 19631-19636.
- 640 58. Rivero RM, Shulaev V, Blumwald E (2009) Cytokinin-dependent photorespiration
641 and the protection of photosynthesis during water deficit. Plant Physiology 150:
642 1530-1540.
- 643 59. Coruzzi G, Birnbaum K, Gifford M, Gutierrez R (2008) Methods of Affecting Plant
644 Growth with microRNA. USA. pp. 110.
- 645 60. Wu G, Poethig RS (2006) Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis*
646 *thaliana* by miR156 and its target SPL3. Development 133: 3539-3547.
- 647 61. Gandikota M, Birkenbihl RP, Hohmann S, Cardon GH, Saedler H, et al. (2007) The
648 miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the *Arabidopsis* SBP box
649 gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings.
650 Plant Journal 49: 683-693.
- 651 62. Hsieh LC, Lin SI, Shih AC, Chen JW, Lin WY, et al. (2009) Uncovering small
652 RNA-mediated responses to phosphate deficiency in *Arabidopsis* by deep
653 sequencing. Plant Physiology 151: 2120-2132.
- 654 63. Weigel HJ, Pacholski A, Burkart S, Helal M, Heinemeyer O, et al. (2005) Carbon
655 turnover in a crop rotation under free air CO₂ enrichment (FACE). Pedosphere
656 15: 728-738.
- 657 64. Jiang DH, Yin CS, Yu AP, Zhou XF, Liang WQ, et al. (2006) Duplication and
658 expression analysis of multicopy miRNA gene family members in *Arabidopsis*
659 and rice. Cell Research 16: 507-518.
- 660 65. Sunkar R, Jagadeeswaran G (2008) In silico identification of conserved microRNAs
661 in large number of diverse plant species. BMC Plant Biology 8: 37.
- 662 66. Hobbie L, McGovern M, Hurwitz LR, Pierro A, Liu NY, et al. (2000) The *axr6*
663 mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene involved in auxin response and
664 early development. Development 127: 23-32.
- 665 67. Hellmann H, Hobbie L, Chapman A, Dharmasiri S, Dharmasiri N, et al. (2003)
666 *Arabidopsis* AXR6 encodes CUL1 implicating SCF E3 ligases in auxin
667 regulation of embryogenesis. Embo Journal 22: 3314-3325.
- 668 68. Binder BM, Walker JM, Gagne JM, Emborg TJ, Hemmann G, et al. (2007) The
669 *Arabidopsis* EIN3 binding F-Box proteins EBF1 and EBF2 have distinct but
670 overlapping roles in ethylene signaling. Plant Cell 19: 509-523.
- 671 69. Mena M, Mandel MA, Lerner DR, Yanofsky MF, Schmidt RJ (1995) A
672 characterization of the MADS-box gene family in maize. Plant Journal 8: 845-
673 854.
- 674 70. Zhao T, Ni Z, Dai Y, Yao Y, Nie X, et al. (2006) Characterization and expression of
675 42 MADS-box genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). Molecular Genetics and
676 Genomics 276: 334-350.
- 677 71. Rancour DM, Park S, Knight SD, Bednarek SY (2004) Plant UBX domain-
678 containing protein 1, PUX1, regulates the oligomeric structure and activity of
679 *arabidopsis* CDC48. Journal of Biological Chemistry 279: 54264-54274.

Parte IV

Discussão e conclusões gerais

4.5 Discussão

Os resultados sugerem fortemente que miRNAs de cana-de-açúcar tem seu perfil de expressão alterado pelo estresse por falta de água, indicando que existem ações de regulação pós-transcricional integrantes do processo de adaptação da planta ao estresse, como já foi observado por outros autores em outras espécies (Zhao et al., 2007; Wei et al., 2009; Covarrubias and Reyes, 2010). Parte dos resultados encontrados são consistentes entre réplicas biológicas e variedades distintas, o que ajudou a identificar alguns dos miRNAs que podem ter maior importância na cana-de-açúcar e alguns que podem estar se destacando em razão das variações esperadas para amostras de campo.

Alguns miRNAs de função conhecida foram identificados como diferencialmente expressos em ambas metodologias. Entre eles, miR160, miR167, miR156/157, miR159/319 e miR528 (alguns miRNAs da mesma família foram anotados com números diferentes e foram mantidos dessa forma), além de muitos miRNAs que foram identificados com maior confiabilidade pelo sequenciamento, incluindo miR172, miR396, miR437 e miR444.

A baixa disponibilidade de informações sobre as funções de muitos dos miRNAs conhecidos é notável. Os últimos anos viram um aumento exuberante de publicações onde os autores identificam grandes números de miRNAs e alvos hipotéticos (Bonnet et al., 2004; Ruby et al., 2006; Hafner et al., 2008; Szittya et al., 2008; Liang et al., 2010; Zhao et al., 2010; Unver et al., 2010), mas estudos mais específicos sobre suas funções não parecem ter a mesma popularidade, como pode-se constatar através da quantidade de revisões recentes centradas nos avanços no conhecimento do processamento de miRNAs na célula (Filipowicz et al., 2008; Voinnet, 2009; Lu and Souret, 2010) e de algumas que apresentem novas informações sobre as vias regulatórias envolvidas no processo de interferência. No entanto a tendência é que essas grandes quantidades de informações passem a ser vigorosamente exploradas e testadas em busca de um maior entendimento da biologia de miRNAs, aumentando as chances de se obter alvos biotecnológicos promissores.

A grande quantidade de candidatos a novos miRNAs chama a atenção. São dados que não estavam disponíveis anteriormente e agora constituem uma base para o avanço do conhecimento sobre a biologia de miRNAs em cana-de-açúcar e espécies próximas.

Nosso trabalho mostrou que a cana de açúcar tem muitos miRNAs conservados que parecem fazer parte da resposta a estresses e também diversos candidatos a miRNAs ainda não descritos. A perspectiva é de que esses dados fomentem muitos estudos na área e permitam o desenvolvimento de cultivares melhor adaptados aos desafios da produção de energia limpa e sustentável.

As duas principais metodologias empregadas no trabalho mostraram-se eficientes dentro das possibilidades. No caso hipotético de se produzir chis baseados nas sequências obtidas por *deep-sequencing* é de se esperar que a robustez dos resultados fosse maior, já que mesmo sem a sequência exata, os miRNAs putativos sugeridos pelo sinal da sonda nochip foram de fato encontrados no sequenciamento. Amostras de campo estão sujeitas a uma miríade de fatores que podem afetar a expressão gênica. Levando em conta a sensibilidade da expressão de miRNAs, essa questão torna-se ainda mais importante. No entanto, não existem razões claras para considerar que um experimento de casa de vegetação possa ter maior ou menor qualidade. Mas se possível, utilizar as duas condições certamente produziria uma riqueza de informações maior que a simples soma das duas abordagens.

4.6 Conclusões

Com base nos extensos resultados obtidos, podemos afirmar que miRNAs de cana-de-açúcar tem sua expressão alterada diante do estresse por seca.

A cana-de-açúcar apresenta muitos miRNAs conhecidos em outras espécies, incluindo alguns específicos de monocotiledôneas e muitos candidatos a novos miRNAs. Obtivemos 320 deles apenas entre os diferencialmente espessos. É provável que o número total exceda significativamente a expectativa de 1% dos transcritos do SUCEST.

Os recursos de sequenciamento de nova geração são muito valiosos na pesquisa de miRNAs, por permitirem aferir a presença e a quantidade de sequências pequenas com alta qualidade. Os dados disponíveis são essenciais para a identificação de alvos e o padrão de expressão de grandes conjuntos de miRNAs específicos de cana-de-açúcar.

Os miRNAs 160, 167, 156/157, 528, 437 e 444 são candidatos primários para estudos de biologia molecular que possam descrever com maior profundidade suas funções e potencial biotecnológico e agronômico.

Referências Bibliográficas

- Alex Adai, Cameron Johnson, Sizolwenkosi Mlotshwa, Sarah Archer-Evans, Varun Manocha, Vicki Vance, and Venkatesan Sundaresan. Computational prediction of miRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genome research*, 15: 78–91, 2005.
- E Allen, B Goldman, L Guo, S Heisel, S Huang, S Ivashuta, E Krieger, J Roberts, and Y Zhang. Plant microRNAs and methods of use thereof., 2008.
- R S Allen, J Li, M I Stahle, A DubrouË, F Gubler, and A A Millar. Genetic analysis reveals functional redundancy and the major target genes of the *Arabidopsis* miR159 family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(41):16371, 2007.
- S Altschul, W Gish, W Miller, E Myers, and D Lipman. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215:403–410, 1990.
- Tzahi Arazi, Mali Talmor-Neiman, Ran Stav, Maike Riese, Peter Huijser, and David C Baulcombe. Cloning and characterization of micro-RNAs from moss. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 43:837–848, 2005.
- Paulo Arruda. Sugarcane transcriptome: A landmark in plant genomics in the tropics. *Genetics and Molecular Biology*, 24:626–627, 2001.
- C Asnaghi, F Paulet, C Kaye, L Grivet, M Deu, J C Glaszmann, and A D’Hont. Application of synteny across Poaceae to determine the map location of a sugarcane rust resistance gene. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 101:962–969, 2000.
- Milo J Aukerman and Hajime Sakai. Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. *The Plant cell*, 15:2730–2741, 2003.
- M J Axtell and D P Bartel. Antiquity of microRNAs and their targets in land plants. *The Plant Cell Online*, 17: 1658, 2005.

- David P Bartel. MicroRNAs : Genomics , Biogenesis , Mechanism , and Function. *Cell*, 116:281–297, 2004.
- D A Benson, I Karsch-Mizrachi, D J Lipman, J Ostell, and D L Wheeler. GenBank: update. *Nucleic Acids Research*, 32(Database Issue):D23, 2004.
- E Bonnet, J Wuyts, and P Rouzé. Detection of 91 potential conserved plant microRNAs in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* identifies important target genes. *PNAS*, 2004.
- E Bray. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*, 2(2):48–54, February 1997. ISSN 13601385. doi: 10.1016/S1360-1385(97)82562-9. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138597825629>.
- R J Britten and E H Davidson. Gene regulation for higher cells: a theory. *Science*, 1969.
- D L Carson and F C Botha. Preliminary analysis of expressed sequence tags for sugarcane. *Crop Science*, 2000.
- D L Carson, B I Hockett, and F C Botha. Sugarcane ESTs differentially expressed in immature and maturing internodal. *Plant science(Limerick)*, 2002.
- R E Casu, C P L Grof, A L Rae, C L McIntyre, C M Dimmock, and J M Manners. Identification of a novel sugar transporter homologue strongly expressed in maturing stem vascular tissues of sugarcane by expressed sequence tag and microarray analysis. *Plant molecular biology*, 52(2):371–386, 2003.
- R E Casu, C M Dimmock, S C Chapman, and C P L Grof. Identification of differentially expressed transcripts from maturing stem of sugarcane by in silico analysis of stem expressed sequence tags and gene expression profiling. *Plant molecular*, 2004.
- Rosanne E Casu, M Manners John, D Bonnett Graham, A Jackson Phillip, C Lynne McIntyre, Dunne Rob, C Chapman Scott, L Raea Anne, and C P L Grof. Genomics approaches for the identification of genes determining important traits in sugarcane. *Field crops research*, 92(2-3):137–147, 2005.
- Manuela M. Chaves, João P. Maroco, and João S. Pereira. Understanding plant responses to drought — from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 30(3):239, 2003. ISSN 1445-4408. doi: 10.1071/FP02076. URL <http://www.publish.csiro.au/?paper=FP02076>.
- Caifu Chen, D.A. Ridzon, A.J. Broomer, Zhaohui Zhou, D.H. Lee, J.T. Nguyen, Maura Barbisin, N.L. Xu, V.R. Mahuvakar, M.R. Andersen, and Others. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 33(20):e179, 2005. ISSN 0305-1048. URL <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/33/20/e179>.

- X Chen. MicroRNA biogenesis and function in plants. *FEBS letters*, 579:59235931, 2005.
- Xuemei Chen. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science (New York, N.Y.)*, 303:2022–2025, 2004.
- Peter J A Cock, Tiago Antao, Jeffrey T Chang, Brad A Chapman, Cymon J Cox, Andrew Dalke, Iddo Friedberg, Thomas Hamelryck, Frank Kauff, Bartek Wilczynski, and Michiel J L de Hoon. Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 25: 1422–1423, 2009.
- Companhia Nacional de Abastecimento CONAB. Safra 2010 / 2011 Terceiro Levantamento Janeiro / 2011. 2011.
- G M Cordeiro, R E Casu, and C L McIntyre. Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross. *Robert J*, 2001.
- G Coruzzi, K D Birnbaum, M Gifford, and R A Gutierrez. Methods of affecting plant growth with microRNA, 2008.
- Alejandra a Covarrubias and José L Reyes. Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs. *Plant, cell & environment*, 33(4):481–9, April 2010. ISSN 1365-3040. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.02048.x. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19781008>.
- A P De Souza, M Gaspar, E A Da Silva, E C Ulian, A J Waclawovsky, Jr. Nishiyama M. Y., R V Dos Santos, M M Teixeira, G M Souza, and M S Buckeridge. Elevated CO2 increases photosynthesis, biomass and productivity, and modifies gene expression in sugarcane. *Plant Cell Environ*, 31(8):1116–1127, 2008.
- A R der Krol, L A Mur, M Beld, J N M Mol, and A R Stuitje. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *The Plant Cell Online*, 2(4):291, 1990.
- A D’hont, L Grivet, P Feldmann, and J C Glaszmann. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Molecular and General*, 1996.
- Dong Ding, Lifang Zhang, Hang Wang, Zhijie Liu, Zuxin Zhang, and Yonglian Zheng. Differential expression of miRNAs in response to salt stress in maize roots. *Annals of botany*, 103:29–38, 2009.
- J Doebley, A Stec, and L Hubbard. The evolution of apical dominance in maize. *Nature*, 386(6624):485–488, 1997.
- N A Eckardt. Small RNA on the Move. *The Plant Cell Online*, 2004.

- J F Emery, S K Floyd, J Alvarez, Y Eshed, and N P Hawker. Radial patterning of Arabidopsis shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Current Biology*, 2003.
- J M Felix, F S Papini-Terzi, F R Rocha, R Z N VÍncio, R Vicentini, M Y Nishiyama, E CÊsar Ulian, G M Souza, and M Menossi. Expression Profile of Signal Transduction Components in a Sugarcane Population Segregating for Sugar Content. *Tropical Plant Biology*, 2(2):98–109, 2009.
- M Fiers, A Burgt, E Datema, J C W Groot, R Ham, Y A Kourmpetis, M Bink, and C J F Braak. In silico miRNA prediction in metazoan genomes: balancing between sensitivity and specificity. *BMC genomics*, 10:204, 2009.
- Witold Filipowicz, Suvendra N Bhattacharyya, and Nahum Sonenberg. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature reviews. Genetics*, 9(2):102–14, February 2008. ISSN 1471-0064. doi: 10.1038/nrg2290. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18197166>.
- A Fire, S Q Xu, M K Montgomery, S A Kostas, S E Driver, and C C Mello. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669):806–811, 1998.
- Marc R Friedländer, Wei Chen, Catherine Adamidi, Jonas Maaskola, Ralf Einspanier, Signe Knespel, and Nikolaus Rajewsky. Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. *Nature biotechnology*, 26(4):407–15, April 2008. ISSN 1546-1696. doi: 10.1038/nbt1394. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18392026>.
- M Gandikota, R P Birkenbihl, S Hohmann, G H Cardon, H Saedler, and P Huijser. The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the Arabidopsis SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *Plant Journal*, 49(4):683–693, 2007.
- José Goldemberg, Suani Teixeira Coelho, and Patricia Guardabassi. The sustainability of ethanol production from sugarcane. *Energy Policy*, 36(6):2086–2097, June 2008. ISSN 03014215. doi: 10.1016/j.enpol.2008.02.028. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301421508001080>.
- Sam Griffiths-Jones, Harpreet Kaur Saini, Stijn van Dongen, and Anton J Enright. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic acids research*, 36:D154–8, 2008.
- L Grivet, J C Glaszmann, M Vincentz, and F Da Silva. ESTs as a source for sequence polymorphism discovery in sugarcane: example of the Adh genes. *TAG Theoretical and*, 2003.
- M Gu, K Xu, A Q Chen, Y Y Zhu, G L Tang, and G H Xu. Expression analysis suggests potential roles of microRNAs for phosphate and arbuscular mycorrhizal signaling in *Solanum lycopersicum*. *Physiologia Plantarum*, 138(2):226–237, 2010.

- S Guo and K J Kemphues. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, 81(4):611, 1995.
- Markus Hafner, Pablo Landgraf, Janos Ludwig, Amanda Rice, Tolulope Ojo, Carolina Lin, Daniel Holoch, Cindy Lim, and Thomas Tuschl. Identification of microRNAs and other small regulatory RNAs using cDNA library sequencing. *Methods (San Diego, Calif.)*, 44(1):3–12, January 2008. ISSN 1046-2023. doi: 10.1016/j.ymeth.2007.09.009. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18158127>.
- I.L. Hofacker. Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic acids research*, 31(13):3429, 2003. ISSN 0305-1048. URL <http://nar.oxfordjournals.org/content/31/13/3429.full>.
- T C Hsiao. Plant Responses to Water Stress. *Annual Review of Plant Physiology*, 24(1):519–570, June 1973. ISSN 0066-4294. doi: 10.1146/annurev.pp.24.060173.002511. URL <http://arjournals.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pp.24.060173.002511>.
- L C Hsieh, S I Lin, A C C Shih, J W Chen, W Y Lin, C Y Tseng, W H Li, and T J Chiou. Uncovering Small RNA-Mediated Responses to Phosphate Deficiency in Arabidopsis by Deep Sequencing. *Plant physiology*, 151(4):2120–2132, 2009.
- N G Inman-Bamber and D M Smith. Water relations in sugarcane and response to water deficits. *Field crops research*, 92:185202, 2005.
- NG Inman-Bamber, GD Bonnett, and MF Spillman. Source–sink differences in genotypes and water regimes influencing sucrose accumulation in sugarcane stalks. *Crop and Pasture*, 60(4):316–327, 2009.
- MW Jones-Rhoades. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular cell*, 14:787799, 2004. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276504003284>.
- M.W. Jones-Rhoades. Prediction of Plant miRNA Genes. *Plant microRNAs: Methods in Molecular Biology*, 592: 19, 2010. doi: 10.1007/978-1-60327-005-2.
- M.W. Jones-Rhoades, D.P. Bartel, and B Bartel. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Plant Biology*, 57(1):19, 2006.
- M T Juarez, J S Kui, J Thomas, B A Heller, and M C P Timmermans. microRNA-mediated repression of rolled leaf1 specifies maize leaf polarity. *Nature*, 428(6978):84–88, 2004.

- Jae-Hoon Jung, Pil Joon Seo, and Chung-Mo Park. MicroRNA biogenesis and function in higher plants. *Plant Biotechnology Reports*, 3:111–126, 2009.
- Robert W Kates and Thomas M Parris. Long-term trends and a sustainability transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100:8062–8067, 2003.
- Joonki Kim, Jae-Hoon Jung, Jose L Reyes, Youn-Sung Kim, Sun-Young Kim, Kyung-Sook Chung, Jin a Kim, Minsun Lee, Yoontae Lee, V Narry Kim, Nam-Hai Chua, and Chung-Mo Park. microRNA-directed cleavage of ATHB15 mRNA regulates vascular development in Arabidopsis inflorescence stems. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 42:84–94, 2005.
- Jan Krüger and Marc Rehmsmeier. RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic acids research*, 34(Web Server issue):W451–4, July 2006. ISSN 1362-4962. doi: 10.1093/nar/gkl243. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16845047>.
- M Labhili, P Joudrier, and M F Gautier. Characterization of cDNAs encoding Triticum durum dehydrins and their expression patterns in cultivars that differ in drought tolerance. *Plant Science*, 112(2):219–230, 1995.
- M Lagos-Quintana, R Rauhut, W Lendeckel, and T Tuschl. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294(5543):853, 2001.
- David M Lapola, Ruediger Schaldach, Joseph Alcamo, Alberte Bondeau, Jennifer Koch, Christina Koelking, and Joerg a Priess. Indirect land-use changes can overcome carbon savings from biofuels in Brazil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(8):3388–93, February 2010. ISSN 1091-6490. doi: 10.1073/pnas.0907318107. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20142492>.
- N Lauter, A Kampani, S Carlson, M Goebel, and S P Moose. microRNA172 down-regulates glossy15 to promote vegetative phase change in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26):9412, 2005.
- R C Lee and V Ambros. An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans. *Science*, 294(5543):862, 2001.
- R C Lee, R L Feinbaum, and V Ambros. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 75(5):843–854, 1993.
- Y Lee, M Kim, J Han, K H Yeom, S Lee, S H Baek, and V N Kim. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*, 23(20):4051–4060, 2004.

- J Li, Z Yang, B Yu, J Liu, and X Chen. Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. *Current Biology*, 15(16):1501–1507, 2005.
- Chengwei Liang, Xiaowen Zhang, Jian Zou, Dong Xu, Feng Su, and Naihao Ye. Identification of miRNA from *Porphyra yezoensis* by high-throughput sequencing and bioinformatics analysis. *PloS one*, 5(5):e10698, January 2010. ISSN 1932-6203. doi: 10.1371/journal.pone.0010698. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2873431&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- K J Livak and T D Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4):402–8, December 2001. ISSN 1046-2023. doi: 10.1006/meth.2001.1262. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>.
- C Llave, K D Kasschau, M A Rector, and J C Carrington. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *The Plant Cell Online*, 14(7):1605, 2002.
- C. Lu and F. Souret. High-Throughput Approaches for miRNA Expression Analysis. *Plant microRNAs: Methods in Molecular Biology*, 592:107, 2010. doi: 10.1007/978-1-60327-005-2. URL <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-60327-005-2>.
- S Lu, Y H Sun, R Shi, C Clark, L Li, and V L Chiang. Novel and mechanical stress-responsive microRNAs in *Populus trichocarpa* that are absent from Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 17(8):2186, 2005.
- A C Mallory, B J Reinhart, M W Jones-Rhoades, G Tang, P D Zamore, M K Barton, and D P Bartel. MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. *The EMBO journal*, 23(16):3356, 2004.
- Allison C Mallory, David P Bartel, and Bonnie Bartel. MicroRNA-directed regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *The Plant cell*, 17:1360–1375, 2005.
- M G Mason, D E Mathews, D A Argyros, B B Maxwell, J J Kieber, J M Alonso, J R Ecker, and G E Schaller. Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in Arabidopsis. *Plant Cell*, 17(11):3007–3018, 2005.
- J S Mattick. Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. *EMBO reports*, 2(11):986–991, 2001.
- R Ming, T A Del Monte, E Hernandez, P H Moore, J E Irvine, and A H Paterson. Comparative analysis of QTLs affecting plant height and flowering among closely-related diploid and polyploid genomes. *Genome*, 45(5):794–803, 2002a.

- R Ming, S C Liu, J E Bowers, P H Moore, J E Irvine, and A H Paterson. Construction of a *Saccharum* consensus genetic map from two interspecific crosses. *Crop Science*, 42(2):570–583, 2002b.
- R Ming, Y W Wang, X Draye, P H Moore, J E Irvine, and A H Paterson. Molecular dissection of complex traits in autopolyploids: mapping QTLs affecting sugar yield and related traits in sugarcane. *Theoretical and Applied Genetics*, 105(2-3):332–345, 2002c.
- A Molnar, F Schwach, D J Studholme, E C Thuenemann, and D C Baulcombe. miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature*, 447:1126–1129, 2007.
- J.M. Morgan. OSMOREGULATION AND WATER STRESS IN HIGHER PLANTS. *Annual Review of Plant Physiology*, 35(1):299–319, 1984. ISSN 0066-4294. URL <http://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.pp.35.060184.001503>.
- C Napoli, C Lemieux, and R Jorgensen. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell Online*, 2(4):279, 1990.
- Eviatar Nevo and Guoxiong Chen. Drought and salt tolerances in wild relatives for wheat and barley improvement. *Plant, cell & environment*, 33(4):670–85, April 2010. ISSN 1365-3040. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.02107.x. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20040064>.
- K. Nobuta, K. McCormick, M. Nakano, and B.C. Meyers. Bioinformatics Analysis of Small RNAs in Plants Using Next Generation Sequencing Technologies. *Plant microRNAs: Methods in Molecular Biology*, 592(1):89–106, 2009. doi: 10.1007/978-1-60327-005-2. URL <http://www.springerlink.com/index/H36750465820P322.pdf>.
- F T S Nogueira, V E De Rosa Jr, M Menossi, E C Ulian, and P Arruda. RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. *Plant physiology*, 132:1811, 2003.
- N Ori, A R Cohen, A Etzioni, A Brand, O Yanai, S Shleizer, N Menda, Z Amsellem, I Efroni, I Pekker, J P Alvarez, E Blum, D Zamir, and Y Eshed. Regulation of LANCEOLATE by miR319 is required for compound-leaf development in tomato. *Nature Genetics*, 39(6):787–791, 2007.
- J F Palatnik, E Allen, X Wu, C Schommer, R Schwab, J C Carrington, and D Weigel. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*, 425(6955):257–263, 2003.
- F S Papini-Terzi, F R Rocha, R Z Nicoliello Vencio, K C Oliveira, J de Maria Felix, R Vicentini, C de Souza Rocha, A C Quirino Simoes, E C Ulian, S Marli Zingaretti Di Mauro, and Others. Transcription profiling of signal transduction-related genes in sugarcane. *DNA research*, 12:27, 2005.

- F.S. Papini-Terzi, F.R. Rocha, R.Z.N. Vêncio, J.M. Felix, D.S. Branco, A.J. Waclawovsky, L.E.V. Del Bem, C.G. Lembke, M.D.L. Costa, M.Y. Nishiyama, and Others. Sugarcane genes associated with sucrose content. *BMC genomics*, 10(1):120, 2009. ISSN 1471-2164. URL <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/10/120>.
- I Papp, M F Mette, W Aufsatz, L Daxinger, S E Schauer, A Ray, J Van Der Winden, M Matzke, and A J M Matzke. Evidence for nuclear processing of plant micro RNA and short interfering RNA precursors. *Plant physiology*, 132(3):1382, 2003.
- Marc Parisien and François Major. The MC-Fold and MC-Sym pipeline infers RNA structure from sequence data. *Nature*, 452:51–55, 2008.
- B J Reinhart, F J Slack, M Basson, A E Pasquinelli, J C Bettinger, A E Rougvie, H R Horvitz, and G Ruvkun. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772):901–906, 2000.
- Brenda J Reinhart, Earl G Weinstein, Matthew W Rhoades, Bonnie Bartel, and David P Bartel. MicroRNAs in plants. *Genes & development*, 16:1616–1626, 2002.
- M.W. Rhoades, B.J. Reinhart, L.P. Lim, C.B. Burge, B. Bartel, and D.P. Bartel. Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, 110(4):513–520, 2002. ISSN 0092-8674.
- R M Rivero, M Kojima, A Gepstein, H Sakakibara, R Mittler, S Gepstein, and E Blumwald. Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(49):19631–19636, 2007.
- R M Rivero, V Shulaev, and E Blumwald. Cytokinin-Dependent Photorespiration and the Protection of Photosynthesis during Water Deficit. *Plant physiology*, 150(3):1530–1540, 2009.
- FR Rocha, FS Papini-Terzi, and MY Nishiyama. Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. *BMC*, 8:71, 2007. URL <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/8/71>.
- G M Rubin, M D Yandell, J R Wortman, G L Gabor Miklos, C R Nelson, I K Hariharan, M E Fortini, P W Li, R Apweiler, and W Fleischmann. Comparative genomics of the eukaryotes. *Science*, 287(5461):2204, 2000.
- J Graham Ruby, Calvin Jan, Christopher Player, Michael J Axtell, William Lee, Chad Nusbaum, Hui Ge, and David P Bartel. Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs

- in *C. elegans*. *Cell*, 127(6):1193–207, December 2006. ISSN 0092-8674. doi: 10.1016/j.cell.2006.10.040. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17174894>.
- Paulo Sérgio Schlögl, Fábio Tebaldi S Nogueira, Rodrigo Drummond, Juliana M Felix, Vicente E De Rosa, Renato Vicentini, Adilson Leite, Eugênio C Ulian, and M Menossi. Identification of new ABA- and MEJA-activated sugarcane bZIP genes by data mining in the SUCEST database. *Plant cell reports*, 27:335–345, 2008.
- C Schommer, J F Palatnik, P Aggarwal, A Chetelat, P Cubas, E E Farmer, U Nath, and D Weigel. Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *Plos Biology*, 6(9):1991–2001, 2008.
- M A Smit and A Singels. The response of sugarcane canopy development to water stress. *Field crops research*, 98(2-3):91–97, 2006.
- Gerd Sparovek, Alberto Barretto, Goran Berndes, Sergio Martins, and Rodrigo Maule. Environmental, land-use and economic implications of Brazilian sugarcane expansion 1996–2006. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 14(3):285–298, November 2008. ISSN 1381-2386. doi: 10.1007/s11027-008-9164-3. URL <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s11027-008-9164-3>.
- C K Stover, X Q Pham, A L Erwin, S D Mizoguchi, P Warrenner, M J Hickey, F S L Brinkman, W O Hufnagle, D J Kowalik, and M Lagrou. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA 01, an opportunistic pathogen. *Nature(London)*, 406(6799):959–964, 2000.
- R Sunkar and J K Zhu. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 16:2001, 2004.
- Ramanjulu Sunkar, Xuefeng Zhou, Yun Zheng, Weixiong Zhang, and Jian-Kang Zhu. Identification of novel and candidate miRNAs in rice by high throughput sequencing. *BMC plant biology*, 8:25, 2008.
- Gyorgy Szittya, Simon Moxon, Dulce M Santos, Runchun Jing, Manuel P S Fevereiro, Vincent Moulton, and Tamas Dalmay. High-throughput sequencing of *Medicago truncatula* short RNAs identifies eight new miRNA families. *BMC genomics*, 9:593, 2008.
- G Tang, B J Reinhart, D P Bartel, and P D Zamore. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes & development*, 17(1):49, 2003.
- T Unver, M Bakar, R C Shearman, and H Budak. Genome-wide profiling and analysis of *Festuca arundinacea* miRNAs and transcriptomes in response to foliar glyphosate application. *Mol Genet Genomics*, 283(4):397–413, 2010.

- E Varkonyi-Gasic, R Wu, M Wood, E F Walton, and R P Hellens. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*, 3(1):12, 2007.
- J C Venter, M D Adams, E W Myers, P W Li, R J Mural, G G Sutton, H O Smith, M Yandell, C A Evans, and R A Holt. The sequence of the human genome. *Science*, 291(5507):1304, 2001.
- A L Vettore, F R Da Silva, E L Kemper, G M Souza, A M Da Silva, M I T Ferro, F Henrique-Silva, . . . A Giglioti, M V F Lemos, and L L Coutinho. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. *Genome research*, 13(12):2725, 2003.
- André L Vettore, Felipe R Da Silva, Edson L Kemper, and Paulo Arruda. The libraries that made SUCEST. *Genetics and Molecular Biology*, 24:17, 2001.
- Olivier Voinnet. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, 136(4):669–87, February 2009. ISSN 1097-4172. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.046. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19239888>.
- Liya Wei, Danfeng Zhang, Fang Xiang, and Zuxin Zhang. Differentially Expressed miRNAs Potentially Involved in the Regulation of Defense Mechanism to Drought Stress in Maize Seedlings. *International Journal of Plant Sciences*, 170:979–989, 2009.
- D Weigel and R Schwab. Means and methods for modifying the biomass of plants., 2005.
- M R Willmann and R S Poethig. Conservation and evolution of miRNA regulatory programs in plant development. *Current opinion in plant biology*, 10:503511, 2007.
- A J Wood and P B Goldsbrough. Characterization and expression of dehydrins in water-stressed Sorghum bicolor. *Physiologia Plantarum*, 99(1):144–152, 1997.
- G Wu and R S Poethig. Temporal regulation of shoot development in Arabidopsis thaliana by miR156 and its target SPL3. *Development*, 133(18):3539–3547, 2006.
- Almir S Zanca, Renato Vicentini, Fausto A Ortiz-Morea, Luiz Ev Del Bem, Marcio J da Silva, Michel Vincentz, and Fabio Ts Nogueira. Identification and expression analysis of microRNAs and targets in the biofuel crop sugarcane. *BMC plant biology*, 10(1):260, November 2010. ISSN 1471-2229. doi: 10.1186/1471-2229-10-260. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21092324>.
- B H Zhang, P A N Xiao Ping, W Qing Lian, G P Cobb, and T A Anderson. Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis. *Cell Research*, 15(5):336–360, 2005.

- B H Zhang, X P Pan, Q L Wang, G P Cobb, and T A Anderson. Computational identification of microRNAs and their targets. *Computational Biology and Chemistry*, 30(6):395–407, 2006.
- Lifang Zhang, Jer-Ming Chia, Sunita Kumari, Joshua C Stein, Zhijie Liu, Apurva Narechania, Christopher A Maher, Katherine Guill, Michael D McMullen, and Doreen Ware. A genome-wide characterization of microRNA genes in maize. *PLoS genetics*, 5:e1000716, 2009.
- Y Zhang. miRU: an automated plant miRNA target prediction server. *Nucleic Acids Research*, 33(Web Server Issue):W701, 2005.
- B Zhao, R Liang, L Ge, W Li, H Xiao, H Lin, K Ruan, and Y Jin. Identification of drought-induced microRNAs in rice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354:585590, 2007.
- Chuan-Zhi Zhao, Han Xia, Taylor Price Frazier, Ying-Yin Yao, Yu-Ping Bi, Ai-Qin Li, Meng-Jun Li, Chang-Sheng Li, Bao-Hong Zhang, and Xing-Jun Wang. Deep sequencing identifies novel and conserved microRNAs in peanuts (*Arachis hypogaea* L.). *BMC plant biology*, 10:3, January 2010. ISSN 1471-2229. doi: 10.1186/1471-2229-10-3. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2826338&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Jian-Kang Zhu. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual review of plant biology*, 53:247–73, January 2002. ISSN 1543-5008. doi: 10.1146/annurev.arplant.53.091401.143329. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12221975>.

Apêndice A

Análise fisiológica

As folhas +1 de plantas obtidas na coleta de sete meses em Alagoas foram utilizadas para as primeiras hibridações. As plantas de três meses também fossem alvo do projeto, as análises fisiológicas mostraram uma diferença notavelmente mais acentuada entre as duas condições de campo (sequeiro e irrigado) aos sete meses. A Figura A.1 ilustra como a seca afeta intensamente o crescimento das plantas ao longo do tempo. Fica evidente nos gráficos que a diferença na altura entre plantas da mesma variedade aos 3 e aos 7 meses aumenta consideravelmente.

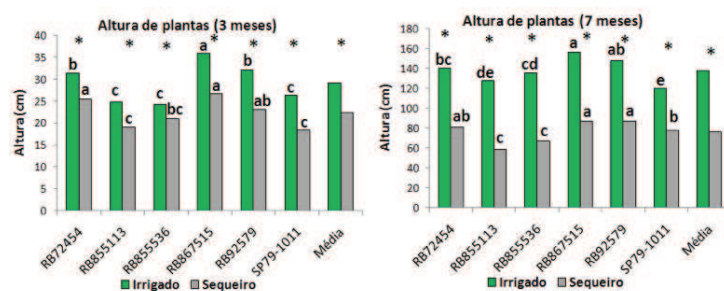


Figura A.1: Altura de plantas de cana-de-açúcar, aos três e sete meses após o plantio, submetidas a dois regimes hídricos (irrigado e sequeiro), em condições de campo no município de Campo Alegre – AL. O eixo x contém os nomes das variedades utilizadas. Médias sobrepostas de * diferem entre os regimes hídricos em cada variedade pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre variedades em cada regime hídrico não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Da mesma forma, o índice de área foliar (LAI) (Figura A.2), uma razão entre área estimada da parte superior das folhas e a área de solo onde a planta cresce. É esperado que haja um efeito cumulativo no LAI diante de qualquer estresse prolongado que prejudique o crescimento da planta. Novamente, é facilmente perceptível o contraste entre as plantas controle (irrigado) e as tratadas (sequeiro). Em ambos os casos (altura da planta e LAI) as variedades dadas como tolerantes se destacam das outras no sétimo mês, mas dificilmente seriam consideradas mais tolerantes se fossem levados em consideração apenas os valores obtidos aos três meses.

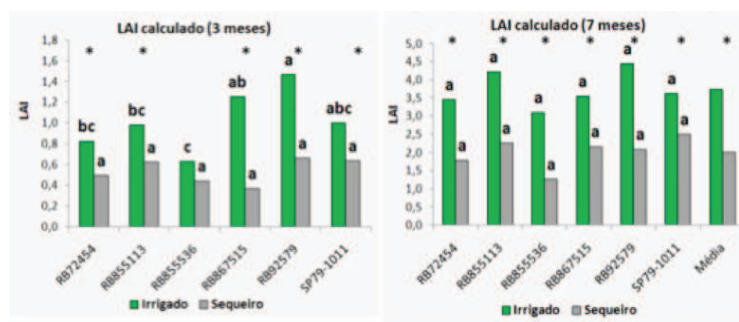


Figura A.2: Índice de área foliar estimado (LAI), em plantas de cana-de-açúcar, aos três e sete meses após o plantio, submetidas a dois regimes hídricos (irrigado e sequeiro), em condições de campo no município de Campo Alegre – AL. O eixo x contém os nomes das variedades utilizadas. Médias sobrepostas de * diferem entre os regimes hídricos em cada variedade pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre variedades em cada regime hídrico não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

A condutância estomática (g_s), que mede a velocidade com que a água evapora dos estômatos, tende a valores menores em situações de baixa disponibilidade de água. É uma informação mais sensível que o potencial hídrico foliar como indicativo de estresse e parece ser regulado por sinais da raiz Inman-Bamber and Smith (2005). A condutância estomática é afetada principalmente pela abertura estomática, regulada pela produção de hormônios, sendo ABA o mais importante sob estresse, e a concentração de CO_2 . No entanto, o que desencadeia a alteração na condutância estomática é o potencial hídrico da raiz, fortemente responsivo à disponibilidade de água no solo e ao nível de compactação do mesmo Inman-Bamber and Smith (2005); Smit and Singels (2006). A detecção da alteração na disponibilidade de água pela raiz gera sinais que acionam os processos

de resposta na parte aérea da planta. A figura A.3 contém os dados de condutância estomática de todas as variedades estudadas, nos dois tempos experimentais. As variedades tolerantes conseguem manter níveis mais altos de condutância estomática no campo sem irrigação aos 7 meses após o plantio, corroborando análises anteriores em cana-de-açúcar Inman-Bamber and Smith (2005); Smit and Singels (2006).

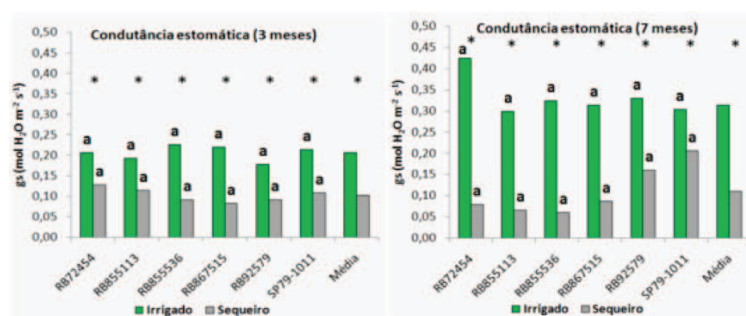


Figura A.3: Condutância estomática em plantas de cana-de-açúcar, aos três e sete meses após o plantio, submetidas a dois regimes hídricos (irrigado e sequeiro), em condições de campo no município de Campo Alegre – AL. O eixo x contém os nomes das variedades utilizadas. Médias sobrepostas de * diferem entre os regimes hídricos em cada variedade pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre variedades em cada regime hídrico não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Já na figura A.4 as barras indicam a quantidade de CO₂ consumida, uma medida indireta da taxa fotossintética. Como as informações de condutância estomática também sugerem, existe uma diferença clara na resposta das variedades. O nível das medidas no campo irrigado é similar entre todas as variedades, mas é diferenciado entre as três variedades mais tolerantes (RB92579, RB867515 e SP79-1011) e as três variedades sensíveis (RB72454, RB85536 e RB855113). Especialmente aos 7 meses, nota-se um padrão muito similar na condutância estomática e na fotossíntese, o que é esperado, já que a fotossíntese depende da absorção de CO₂ através dos estômatos. A transpiração, cujas medições encontram-se na figura A.5, é mais um parâmetro importante na caracterização da resposta ao estresse, por estar diretamente ligado ao metabolismo da planta. Mais um vez, a proporção entre as medidas nos experimentos irrigado e sequeiro para cada variedade é similar, especialmente aos 7 meses, e é possível verificar que a resposta das três tolerantes é

melhor.

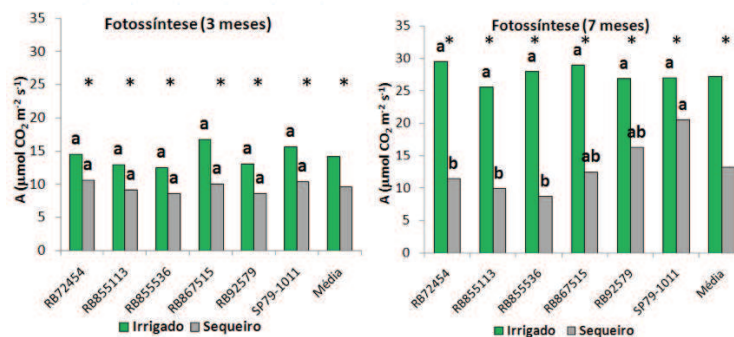


Figura A.4: Fotossíntese em plantas de cana-de-açúcar, aos três e sete meses após o plantio, submetidas a dois regimes hídricos (irrigado e sequeiro), em condições de campo no município de Campo Alegre – AL. O eixo x contém os nomes das variedades utilizadas. Médias sobrepostas de * diferem entre os regimes hídricos em cada variedade pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre variedades em cada regime hídrico não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

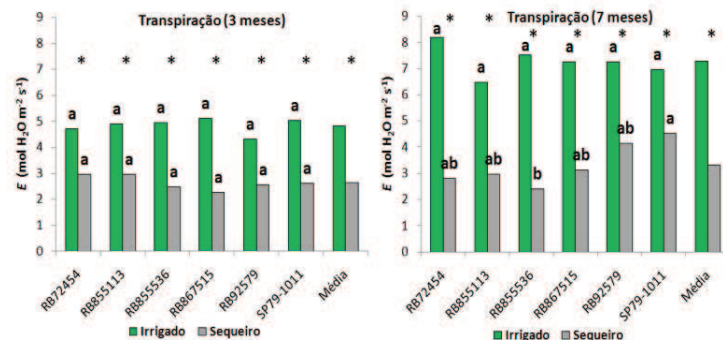


Figura A.5: Transpiração foliar em plantas de cana-de-açúcar, aos três (A) e sete meses (B) após o plantio, submetidas a dois regimes hídricos (irrigado e sequeiro), em condições de campo no município de Campo Alegre – AL. O eixo x contém os nomes das variedades utilizadas. Médias sobrepostas de * diferem entre os regimes hídricos em cada variedade pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre variedades em cada regime hídrico não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

A indicação das variedades RB867515 (tolerante) e RB85536 (sensível), cultivadas em Alagoas, para os ensaios de biologia molecular deste projeto, mostrou-se adequada por conta das respostas à seca observadas em cada variedade e a ausência de contra-tempos como chuvas em

dias de coleta e atrasos no plantio nesta localidade. Um fator importante na escolha de RB867515 e RB85536 foi o parentesco próximo destas variedades (são derivadas do mesmo cultivar), o que forneceria um cenário ideal para a identificação de características determinantes na tolerância ou susceptibilidade à falta de água.

As tabelas A1, A2 e A3 listam todas as médias dos parâmetros considerados na análise das seis variedades estudadas, independentes de tratamento. A figura 1 mostra a diferença de produtividade entre as variedades nos dois tratamentos. As variedades RB867515 (tolerante) e RB85536 (sensível), utilizadas nos experimentos subsequentes, apresentam desempenhos diferentes tanto sob irrigação quanto em sequeiro, segundo o resultado do teste de comparação múltipla de Tukey.

Tabela A1. Média das cultivares para os diferentes parâmetros analisados três meses após o plantio.

Parâmetro	Variedade					
	RB72454	RB855113	RB855536	RB867515	RB92579	SP79-1011
Crescimento						
Altura de plantas (cm)	28,47b	21,94c	22,62c	31,35a	27,59b	22,09c
Comprimento foliar (cm)	102,04a	92,44bc	98,13ab	96,31abc	88,46c	92,36bc
Largura foliar (cm)	2,40c	2,68b	2,21c	3,03a	2,79ab	2,82ab
NFE	5,37 a	4,98ab	5,15ab	4,86b	5,00ab	5,33a
NFV	8,18a	7,7ab	7,85ab	7,38b	7,53ab	7,31b
NPLC	30,38c	41,63ab	31,75bc	35,25bc	49,00a	40,63abc
Área Foliar (cm ² planta ⁻¹)	1800 a	1505 bc	1366 c	1684 ab	1620 abc	1574 abc
IAF	0,66 b	0,80 ab	0,53 b	0,81 ab	1,06 a	0,82 ab
Pigmentos						
Clorofila a (mg g ⁻¹ MF)	1,55bc	1,56bc	1,78a	1,48c	1,69ab	1,41c
Clorofila b (mg g ⁻¹ MF)	0,43bc	0,44bc	0,52a	0,41c	0,49ab	0,40c
Clorofila Total	1,98 bc	2,00bc	2,29a	1,89c	2,18ab	1,80c
Clorofila a/b (mg g ⁻¹ MF)	3,62a	3,52a	3,42a	3,6a	3,56a	3,55a
Carotenos (μmol g ⁻¹ MF)	0,51b	0,48bc	0,5b	0,45bc	0,62a	0,41c
SPAD	39,46a	38,29a	40,11a	37,34ab	34,78b	38,64a
Bioquímica						
Prolina (μmol g ⁻¹ MS)	1,13a	1,34a	1,30a	1,23a	1,39a	1,21a
Açúcares solúveis (mg g ⁻¹ MS)	63,42bc	71,19ab	76,61a	73,51ab	50,96c	56,26c
Proteínas solúveis (mg g ⁻¹ MS)	18,66a	17,09a	17,26a	15,99a	15,58a	18,21a
Aminoácidos (μmol g ⁻¹ MS)	19,33a	19,85a	17,41ab	13,66b	15,61ab	6,64c
Trocas gasosas						
Fotossíntese (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	12,54a	11,03a	10,54a	13,37a	10,78a	13,02a
Condutância (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	0,17a	0,15a	0,16a	0,15a	0,13a	0,16a
Transpiração (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	3,84a	3,93a	3,72a	3,69a	3,42a	3,83a
A/E	3,39a	2,92a	3,02a	3,82a	3,38a	3,58a
A/gs	88,53a	83,48a	83,89a	105,65a	99,62a	91,06a
Fluorescência						
Fv/Fm (Antemanhã)	0,78ab	0,80a	0,79ab	0,80a	0,77b	0,80a
Fv/Fm (Tarde)	0,72ab	0,74a	0,72ab	0,72ab	0,69b	0,73ab
ΦPSII	0,39a	0,38a	0,36a	0,34a	0,39a	0,38a
Potencial hídrico						
Antemanha (MPa)	-0,56b	-0,61b	-0,31a	-0,68bc	-0,78c	-0,58b
Meio-dia (MPa)	-1,74b	-1,69b	-1,68b	-1,71b	-1,73b	-1,44a
Potencial osmót.						
Antemanha (MPa)	-0,66abc	-0,72c	-0,70bc	-0,7bc	-0,65ab	-0,63a
Meio-dia (MPa)	-1,07a	-1,12a	-1,17a	-1,18a	-1,08a	-1,10a

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste Tukey (P<0,05).

Tabela A2. Média das cultivares para os diferentes parâmetros analisados sete meses após o plantio.

Parâmetro	Variedade					
	RB72454	RB855113	RB855536	RB867515	RB92579	SP79-1011
Crescimento						
Altura de plantas (cm)	110,29b	93,5 d	101,14c	122,20a	117,69a	99,14cd
Comprimento foliar (cm)	119,68a	111,35ab	107,05b	116,6 ab	110,13ab	116,1ab
Largura foliar (cm)	3,57cd	4,11ab	3,19d	4,16ab	3,89bc	4,33a
NFE	5,46a	5,38ab	5,11abc	4,93cd	5,04bc	4,54d
NFV	7,93a	7,7ab	6,98cd	6,95cd	7,18bc	6,35d
NPLC	80,25b	86,63ab	82,88ab	82,25b	101,25a	91,00ab
Área Foliar (cm ² planta ⁻¹)	2564ab	3001a	2114b	2844a	2554ab	2772a
IAF	2,62a	3,24a	2,17a	2,85a	3,26a	3,06a
Pigmentos						
Clorofila a (mg g ⁻¹ MF)	1,31a	1,22ab	1,05bc	1,11abc	1,01c	1,07bc
Clorofila b (mg g ⁻¹ MF)	0,42a	0,41ab	0,36abc	0,35bc	0,33c	0,36abc
Clorofila Total (mg g ⁻¹ MF)	1,72a	1,63ab	1,41bc	1,46abc	1,34c	1,42bc
Clorofila a+b	3,09a	2,99a	2,94a	3,14a	3,11a	2,97a
Carotenos (μmol g ⁻¹ MF)	0,45a	0,38ab	0,31b	0,33b	0,31b	0,32b
SPAD	37,05a	36,45a	36,91a	37,33a	35,43a	34,93a
Bioquímica						
Prolina (μmol g ⁻¹ MS)	0,66a	0,75a	0,84a	0,7a	0,74a	0,65a
Açúcares solúveis (mg g ⁻¹ MS)	102,53ab	105,45a	95,21abc	83,49c	91,00abc	87,02bc
Proteínas solúveis (mg g ⁻¹ MS)	33,04bc	33,09bc	38,71a	31,24bc	35,81ab	28,70c
Aminoácidos (μmol g ⁻¹ MS)	45,99bc	43,33bc	60,42a	51,98ab	61,21a	33,60c
Trocas gasosas						
Fotossíntese (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	20,51ab	17,75b	18,34ab	20,75ab	21,60ab	23,77a
Condutância (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	0,25a	0,18a	0,19a	0,2a	0,25a	0,26a
Transpiração (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	5,50a	4,71a	4,96a	5,19a	5,71a	5,74a
A/E	3,82ab	3,63b	3,73ab	4,10ab	3,87ab	4,41a
A/gs	114,98a	122,33a	124,57a	125,81a	102,19a	107,50a
Fluorescência						
Fv/Fm (Antemanhã)	0,78ab	0,79a	0,76b	0,78a	0,77ab	0,78a
Fv/Fm (Tarde)	0,70bc	0,72ab	0,68c	0,71abc	0,71abc	0,74a
ΦPSII	0,47a	0,48a	0,41a	0,46a	0,41a	0,45a
Potencial hídrico						
Antemanha (MPa)	-0,22a	-0,31ab	-0,32abc	-0,27ab	-0,40bc	-0,45c
Meio-dia (MPa)	-1,74b	-1,65b	-1,70b	-1,64b	-1,67b	-1,48a
Potencial osmót.						
Antemanha (MPa)	-0,82ab	-0,82ab	-0,86b	-0,82ab	-0,79ab	-0,76a
Meio-dia (MPa)	-1,06a	-1,06a	-1,09a	-1,07a	-1,03a	-0,98a

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste Tukey (P<0,05).

Tabela A3. Média das cultivares para os diferentes parâmetros analisados onze meses após o plantio.

Parâmetro	Variedade					
	RB72454	RB855113	RB855536	RB867515	RB92579	SP79-1011
Crescimento						
Altura de plantas (cm)	225,83b	214,98b	260,87a	289,31a	265,61a	217,66b
Comprimento foliar (cm)	143,02ab	136,75b	138,47b	153,21a	132,72b	146,22ab
Largura foliar (cm)	4,36bc	5,01a	4,12c	4,96ab	5,02a	4,95ab
NFE	5,37ab	5,42a	4,87ab	4,72ab	4,92ab	4,25c
NFV	7,37a	7,40a	6,87a	6,72a	6,92a	6,25a
NPLC	41,87b	74,00a	77,75a	73,62a	92,25a	79,12a
Área Foliar (cm ² planta ⁻¹)	3593a	3815a	2975a	3816a	3580a	3476a
IAF	0,65b	0,79ab	0,53a	0,80ab	1,06a	0,81ab
Brix Campo	11,20a	10,66a	12,96a	13,05a	13,12a	11,66a
Comprimento do entrenó 3	14,25a	14,08a	14,95a	13,45a	14,23a	13,15a
Diâmetro do entrenó 3	2,92a	2,92a	2,88a	2,96a	2,88a	2,88a
Pigmentos						
Clorofila a (mg g ⁻¹ MF)	0,96a	0,94a	0,85a	0,98a	0,99a	1,00a
Clorofila b (mg g ⁻¹ MF)	0,28a	0,28a	0,26a	0,29a	0,32a	0,30a
Clorofila Total (mg g ⁻¹ MF)	1,25a	1,23a	1,13a	1,27a	1,32a	1,30a
Clorofila a/b	3,34ab	3,26ab	3,18ab	3,40a	3,11b	3,30ab
Carotenos (μmol g ⁻¹ MF)	0,34a	0,28ab	0,25b	0,30ab	0,34a	0,30ab
SPAD	32,42a	32,47a	29,85ab	30,28ab	28,26b	29,42ab
Bioquímica						
Prolina (μmol g ⁻¹ MS)	1,00a	1,12a	1,00a	1,00a	1,00a	0,87a
Açúcares solúveis (mg g ⁻¹ MS)	33,62a	33,12a	32,62a	36,00a	32,37a	31,12a
Proteínas solúveis (mg g ⁻¹ MS)	18,37a	16,25a	17,87a	15,37a	19,75a	15,62a
Aminoácidos (μmol g ⁻¹ MS)	20,50a	17,25a	11,62a	18,50a	20,75a	13,50a
Trocas gasosas						
Fotossíntese (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	13,16a	9,22a	10,65a	13,69a	13,68a	11,52a
Condutância (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	0,09ab	0,06b	0,08ab	0,11a	0,10ab	0,075ab
Transpiração (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	2,98ab	2,21b	2,44ab	3,13a	3,05a	2,69ab
A/E	4,39a	3,99a	3,79a	4,31a	4,39a	4,37a
A/gs	143,37a	151,81a	140,98a	140,23a	142,77a	161,01a
Fluorescência						
Fv/Fm (Antemãhã)	0,78a	0,78a	0,78a	0,79a	0,75b	0,78a
Fv/Fm (Tarde)	0,76a	0,76a	0,77a	0,76a	0,75a	0,75a
ΦPSII	0,27a	0,25a	0,29a	0,27a	0,23a	0,25a
Potencial hídrico						
Antemãhã (MPa)	-0,32ab	-0,38ab	-0,31ab	-0,38ab	-0,47b	-0,24a
Meio-dia (MPa)	-1,63bc	-1,67bc	-1,52b	-1,68bc	-1,76c	-1,36a
Potencial osmót,						
Antemãhã (MPa)	-0,66a	-0,82a	-0,72a	-0,71a	-0,69a	-0,74a

Tabela A3. Média das cultivares para os diferentes parâmetros analisados onze meses após o plantio.

Meio-dia (MPa)	-0,80a	-0,88a	-0,78a	-0,87a	-0,89a	-0,77a
Dados da Indústria						
Brix (%)	20,41a	20,06ab	19,85ab	19,86ab	20,43a	19,31b
Pureza (%)	87,20a	85,49a	86,86a	85,82a	87,34a	86,76a
Fibra (%)	14,01a	13,59a	14,17a	13,77a	13,46a	13,99a
Pol (%)	14,55ab	14,24ab	14,05ab	13,99ab	14,73a	13,70b
ART (%)	16,01ab	15,71ab	15,49ab	15,45ab	16,19a	15,12b
ATR (%)	142,50ab	139,86ab	137,85ab	137,56ab	144,15a	134,57b
Produtividade (t ha ⁻¹)	81,47cd	83,20cd	76,63d	107,14ab	113,09a	93,25bc

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste Tukey (P<0,05),

Apêndice B

Dados de variedades aparentadas



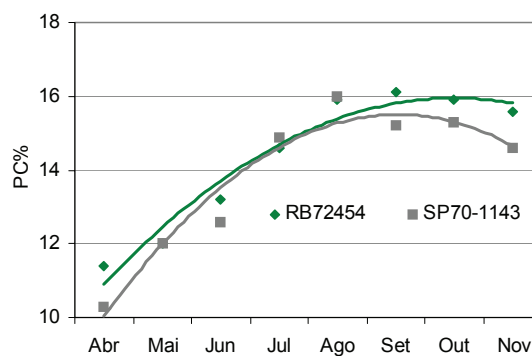
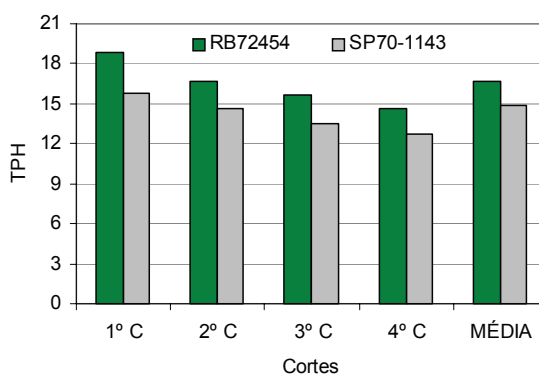
RB72454

(Genitores: CP53-76 x ?)

Aspectos Gerais

Touceiramento médio, com colmos eretos, empalhados, de diâmetro médio, e de cor verde clara, com mancha de cera escurificada.

CARACTERÍSTICAS		RB72454
Prod. Agrícola		Alta
Colheita		Set-Nov
Brot. Soca	Man. Queimada	Boa
	Mecaniz. Crua	Regular
Perfilham.	Cana planta	Médio
	Cana soca	Médio
Fechamento		Bom
Tombamento		Raro
Florescimento		Eventual
Chochamento		Ausente
PUJ		Médio
Exigência em Ambientes		Média
Teor de sacarose		Alto
Teor de fibra		Médio
Carvão		Intermediária
Ferrugem		Resistente
Escaldadura		Resistente
Mosaico		Intermediário
Estrias vermelhas		Suscetível
Falsa est. vermelha		Intermediária



Recomendações de Manejo

Não plantar em épocas frias, especialmente nos solos mais argilosos; evitar corte em julho-agosto nos solos argilosos e ressecados em condições de estresse hídrico. Com auxílio de maturadores pode ser realizada a colheita de cana-planta antes de julho.

Destaques

Ampla adaptabilidade e alta estabilidade; alta produtividade agrícola.

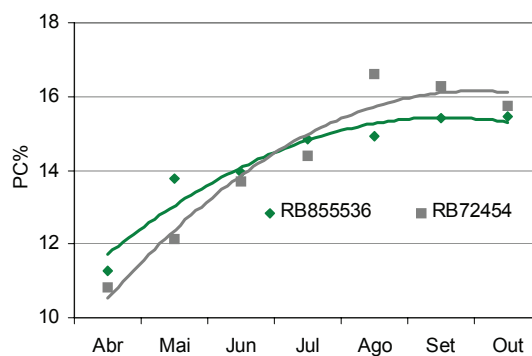
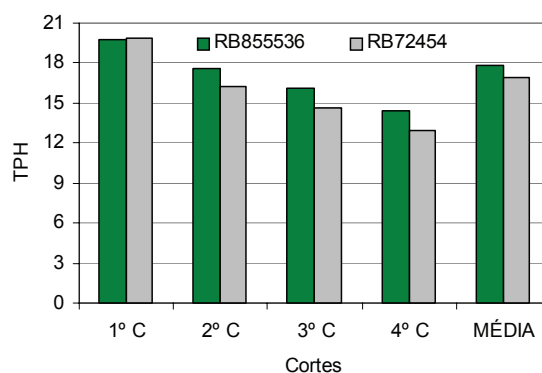


RB855536

(Genitores: SP70-1143 x RB72454)

Aspectos Gerais

Touceiramento bom, touceiras semi-abertas e colmos eretos, empalhados, com bainhas semi-abertas, de fácil despalha, de diâmetro médio e de cor verde arroxeada, quase se acentua quando expostos.



CARACTERÍSTICAS		RB855536
Prod. Agrícola		Alta
Colheita		Jul/Out
Brot. Soca	Man. Queimada	Ótima
	Mecaniz. Crua	Ótima
Perfilham.	Cana planta	Médio
	Cana soca	Alto
Fechamento		Ótimo
Tombamento		Não
Florescimento		Ausente
Chochamento		Ausente
PUI		Médio
Exigência em Ambientes		Alta
Teor de sacarose		Alto
Teor de fibra		Baixo
Carvão		Resistente
Ferrugem		Resistente
Escaldadura		Resistente
Mosaico		Resistente
Estrias vermelhas		Resistente
Falsa est. vermelha		Resistente

Recomendações de Manejo

Plantar em ambientes favoráveis com boa disponibilidade de água; plantio precoce (dezembro a janeiro) pode levar ao estresse hídrico muito forte se o inverno (julho a agosto) for muito seco.

Destaques

Alta produtividade agroindustrial e ótima brotação de soqueira, mesmo sob palha; porte ereto e excelente colheitabilidade. Ausência de florescimento.

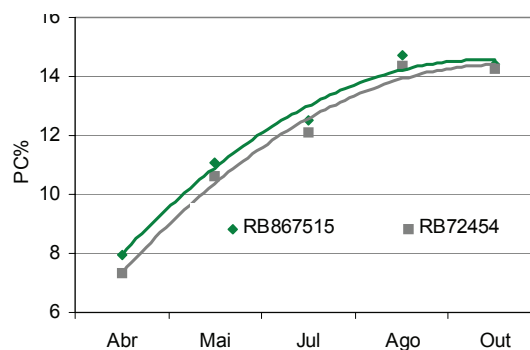
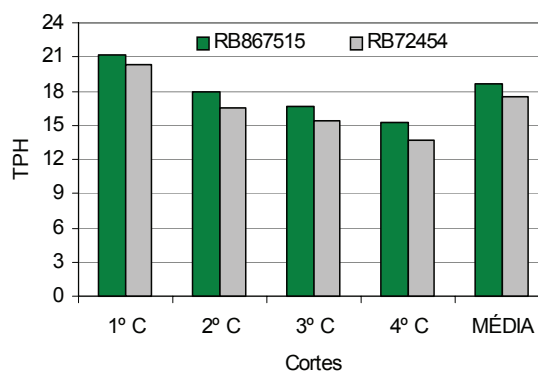


RB867515*

(Genitores: RB72454 x ?)

Aspectos Gerais

Alta velocidade de crescimento, porte alto, hábito de crescimento ereto, alta densidade de colmo, de cor verde arroxeado que se acentua quando expostos e fácil despalha.



CARACTERÍSTICAS		RB867515
Prod. Agrícola		Alta
Colheita		Jul/Set
Brot. Soca	Man. Queimada	Boa
	Mecaniz. Crua	Boa
Perfilham.	Cana planta	Baixo
	Cana soca	Médio
Fechamento		Bom
Tombamento		Eventual
Florescimento		Eventual
Chochamento		Médio
PUI		Longo
Exigência em Ambientes		Baixa
Teor de sacarose		Alto
Teor de fibra		Médio
Carvão		Resistente
Ferrugem		Resistente
Escaldadura		Resistente
Mosaico		Resistente
Estrias vermelhas		Intermediária
Falsa est. vermelha		Intermediária

Recomendações de Manejo

Não deve ser plantada em ambientes favoráveis devido à incidência de estrias vermelhas. Nos ambientes de alto potencial de produção há possibilidades, devido à alta produtividade agrícola, de tombamento e atraso de maturação.

Destaques

Tolerante à seca e boa brotação de soqueira, mesmo colhida crua; alto teor de sacarose, crescimento rápido com alta produtividade.

* Variedade obtida pela Universidade Federal de Viçosa

Apêndice C

Resultados adicionais

Tabela C.1: miRNAs de cana-de-açúcar identificados em hibridações em microarranjo.

Nome	Sequência	Novo / miRBase
ath-miR159a	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA	sim
aqc-miR159	UUUGGACUGAAGGGAGCUCUA	sim
ath-miR159b	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUU	sim
ath-miR159c	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCCU	sim
gma-miR319a	UUGGACUGAAGGGAGCUCCC	sim
osa-miR159a.1	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUG	sof-miR159a
osa-miR159c	AUUGGAUUGAAGGGAGCUCCA	sim
osa-miR159d	AUUGGAUUGAAGGGAGCUCCG	sim
osa-miR159e	AUUGGAUUGAAGGGAGCUCCU	sim
osa-miR159f	CUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA	sim
osa-miR396f	UCUCCACAGGCUUUCUUGAACU	sim
peu-miR2910	UAGUUGGUGGAGCGAUUUGUC	sim
peu-miR2911	GGCCGGGGGACGGGCUGGGA	sim
peu-miR2914	CAUGGUGGUGACGGGUGACGGAG	sim
ppt-miR894	CGUUUCACGUCGGGUUCACC	sim
pta-miR159a	UUGGAUUGAAGGGAGCUCCA	sim

NM: número de *mismatches*, TM: tamanho do miRNA maduro. Continua na página seguinte

Nome	Sequência	Novo / miRBase
pta-miR159c	CUUGGAUUGAAGGGAGCUCCC	sim
pta-miR319	UUGGACUGAAGGGAGCUCC	sim
ptc-miR1450	UUCAAUGGCUCGGUCAGGUUAC	sim
ptc-miR159d	CUUGGAUUGAAGGGAGCUCCU	sof-miR159c
ptc-miR159f	AUUGGAGUGAAGGGAGCUCGA	sim
sbi-miR396d	CUCCACAGGCUUUCUUGAACUG	sim
sbi-miR396e	UCCACAGGCUUUCUUGAACUG	sim
sly-miR319	AUUAAUAAAGAGUGC UAAAGU	sim
vvi-miR319b	CUUGGACUGAAGGGAGCUCCC	sim
sof-miR159e	UUUGGAUUGAAAGGAGCUCUU	sof-miR159e
ppt-miR167	GGAAGCUGCCAGCAUGAUCCU	sim
ath-miR167d	UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUGG	sim
gma-miR167c	UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUG	sof-miR167b
gma-miR167e	UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUU	sim
vvi-miR167c	UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUC	sim
ath-miR167a	UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUA	sim
ath-miR168a	UCGCUUGGUGCAGGUCGGGAA	sim
osa-miR168a	UCGCUUGGUGCAGAUCCGGAC	sof-miR168a
pta-miR159b	UUGGAUUGAAGAGAGCUCCC	sim
ath-miR167c	UAAGCUGCCAGCAUGAUCUUG	sim
osa-miR528	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	sim
osa-miR530-5p	UGCAUUUGCACCUGCACCUA	sim
osa-miR1436	ACAUAUUGGGACGGAGGGAGU	sim
ath-miR160a1	UGCCUGGCUCCCUGUAUGCCA	sim
ppt-miR160b1	CGCCUGGCUCCCUGUAUGCCA	sim
sof-miR168b	UCGCUUGGGCAGAUCCGGGAC	sof-miR168b
sbi-miR156e	UGACAGAAGAGAGCGAGCAC	sim
ath-miR156a	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC	sof-miR156
ath-miR156g	CGACAGAAGAGAGUGAGCAC	sim

NM: número de *mismatches*, TM: tamanho do miRNA maduro. Continua na página seguinte

Continuação		
Nome	Sequência	Novo / miRBase
ptc-miR319e	UUGGACUGAAGGGAGCUCCU	sim
ath-miR319a	UUGGACUGAAGGGAGCUCCCU	sim
ath-miR319c	UUGGACUGAAGGGAGCUCCUU	sim
ptc-miR167h	UGAAGCUGCCAACAUGAUCUG	sim

NM: número de *mismatches*, TM: tamanho do miRNA maduro.

Tabela C.2: miRNAs mais expressos em folha de cana-de-açúcar.

Sonda	Sinal médio	Observação
ptc-miR1450	51222.2325	Igual a ptc-miR1450
SCJFRZ1007C01.g	18727.015	
osa-miR159a.1	18593.46	
ath-miR159a	17111.045	
ath-miR159b	16882.0925	
osa-miR159f	15904.34	
osa-miR159d	10419.505	
ath-miR159c	10338.875	
osa-miR159e	9478.535	
ptc-miR159d	9354.995	
osa-miR159c	9107.13	
sly-miR319	7932.1425	
sof-miR159e	7386.055	
ptc-miR319e	5914.7375	
ath-miR319c	5677.5275	
osa-miR168a	5620.52	Igual a osa-miR528
aqc-miR159	5312.0325	
pta-miR159a	5308.0375	
SCUTSD1026H02.g	5231.4575	
osa-miR528	5129.9475	Igual a osa-168a
SCCCST1005H07.g	5027.8725	
SCMCLR1010B03.g	4943.6975	Igual a osa-168a
peu-miR2910	4763.22	
gma-miR319a	4374.89	Igual a gma-167c
ppt-miR894	2838.71	
SCMCSD2060C04.g	2527.84	
gma-miR167c	2476.3875	
SCSFSD1065B12.g	2413.375	Igual a gma-167c
ath-miR167d	2068.425	
gma-miR167e	1991.57	
ath-miR167a	1755.545	
ppt-miR167	1415.45	