



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO

Karolline Raimundo da Silva

**Modulação da expressão gênica das proteínas ligantes ao RNA de dupla-fita (DRBs) em
Arabidopsis thaliana durante infecção fúngica**

Florianópolis

2020

Karolline Raimundo da Silva

**Modulação da expressão gênica das proteínas ligantes ao RNA de dupla-fita (DRBs) em
Arabidopsis thaliana durante infecção fúngica**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Profa. Franceli Rodrigues Kulcheski, Dr^a.
Coorientador: Prof. Marciel João Stadnik, Dr.

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Karolline Raimundo da
Modulação da expressão gênica das proteínas ligantes ao
RNA de dupla-fita (DRBs) em *Arabidopsis thaliana* durante
infecção fúngica / Karolline Raimundo da Silva ;
orientadora, Franceli Rodrigues Kulcheski, coorientador,
Marciel João Stadnik, 2020.
81 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento,
Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. *Alternaria
brassicicola*. 3. *Colletotrichum higginsianum*. 4.
microRNAs. 5. RT-qPCR. I. Kulcheski, Franceli Rodrigues .
II. Stadnik, Marciel João . III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e do Desenvolvimento. IV. Título.

Karolline Raimundo da Silva

**Modulação da expressão gênica das proteínas ligantes ao RNA de dupla-fita (DRBs) em
Arabidopsis thaliana durante infecção fúngica**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Profª. Franceli Rodrigues Kulcheski, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Guilherme De Toledo E Silva, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Robson Marcelo di Piero, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado
adequado para obtenção do título de mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Profª. Evelise Maria Nazari, Dra.
Coordenadora do Programa

Profª. Franceli Rodrigues Kulcheski, Dra.
Orientadora

Florianópolis, 2020.

À minha estrelinha, meu raio de luz, que tanto se orgulhou de mim em vida e hoje, no plano superior, vibra com mais uma conquista. Para ti mamãe, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por me conceder saúde, paciência, sabedoria e força para conseguir concluir mais esta etapa.

Ao meu pai Luiz, pelo inestimável amor, companheirismo e apoio. Obrigada por não me deixar cair durante o momento mais difícil de nossas vidas e por estar sempre comigo, mesmo nos dias em que a distância nos separava.

À minha mãe Sileide (*in memoriam*), por ser minha inspiração durante todos esses anos em que estivemos juntas e por sempre me encorajar a ser melhor. Obrigada por me incentivar a iniciar o mestrado. A senhora foi a minha força para continuar, enviando energias positivas, onde quer que esteja.

À Prof.^a Dr.^a Franceli Rodrigues Kulcheski, pela oportunidade de orientação e por seus ensinamentos, paciência e confiança ao longo desse trabalho. Por muitas vezes, não foi somente professora, mas uma grande amiga e mãezinha. É um prazer imenso tê-la como orientadora, além de ser uma excelente profissional, na qual me espelho.

Ao Prof. Dr. Marciel João Stadnik, por aceitar o convite para coorientação, ceder seu laboratório para realização de parte dos experimentos e por todo o auxílio em relação às infecções fúngicas.

Aos professores do Programa de Pós Graduação, por todos os ensinamentos.

Aos meus colegas de mestrado, em especial, os amigos Luiz Gustavo, Talita, Fabiane e Ariane, pela convivência e parceria.

Aos amigos de Joinville, por entenderem a minha ausência em muitos momentos e por sempre torcerem por mim.

À colega do Laboratório de Biologia Molecular Vegetal, Sarah, pelo companheirismo e cafezinhos da tarde.

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia, principalmente ao Dr. Mateus Brusco de Freitas, pelo auxílio com os processos de infecção fúngica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade de poder expandir o meu conhecimento;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

As proteínas do domínio de ligação a RNA dupla fita (dsRBPs) foram caracterizadas em eucariotos e procariotos e estão envolvidas em todos os aspectos da biologia do RNA, incluindo síntese, transporte, processamento, tradução e degradação. O genoma de *Arabidopsis thaliana* codifica cinco proteínas ligantes à RNA dupla fita (DRB), uma família de dsRBPs, denominadas DRB1 a DRB5. As DRBs são caracterizadas por dois domínios de ligação a RNA dupla fita na extremidade N-terminal e estão envolvidas na biogênese de pequenos RNAs, especialmente na via de microRNAs (miRNAs) e trans-acting siRNAs (tasiRNAs). Estudos anteriores mostraram que algumas proteínas DRBs estão envolvidas em respostas a infecções virais e bacterianas. DRB3 participa da defesa mediada pela metilação de DNA contra vírus, enquanto DRB4 altera sua localização subcelular para interagir com o RNA viral, controlando a infecção. Além disso, DRB4 também participa de mecanismos de resistência durante doenças bacterianas. No entanto, as DRBs não foram exploradas durante respostas a doenças fúngicas. Os fungos desempenham um papel dominante entre os fitopatógenos, causando epidemias devastadoras para as espécies vegetais e são classificados pelo estilo de vida como necrotróficos, biotróficos e hemibiotróficos. Por esse motivo, esse estudo tem como objetivo investigar o possível envolvimento de DRBs em *A. thaliana* infectada pelo fungo necrotrófico *Alternaria brassicicola* e pelo fungo hemibiotrófico *Colletotrichum higginsianum*. Analisamos a expressão gênica de DRBs e miRNAs do ecótipo *A. thaliana* Col-0 após a inoculação com a cepa CBS 125088 de *A. brassicicola* e cepa IMI 349063 de *C. higginsianum*. As plantas foram cultivadas em câmaras de crescimento e as folhas de plantas adultas de três replicatas biológicas foram coletadas dos grupos infectados e controle às 6, 12, 24 e 48 horas após a inoculação. O RNA total foi extraído e a transcrição reversa foi realizada posteriormente. Foi realizada PCR quantitativa e, para a análise de expressão relativa, utilizou-se *Actina* e *Ubiquitina* como genes de referência. Em plantas infectadas com *A. brassicicola*, também foi analisada a expressão dos genes de miRNAs *MIR164*, *MIR169* e *MIR172*, usando *MIR159* e *MIR396* como genes de referência. Os resultados demonstram que *DRB1*, *DRB3*, *DRB4* e *DRB5* foram expressos diferencialmente entre plantas infectadas e controle em alguns pontos da avaliação durante a infecção por *A. brassicicola*, e *DRB3*, *DRB4* e *DRB5* foram modulados durante a infecção por *C. higginsianum*. Além disso, também foi encontrada modulação na expressão dos genes *MIR169* e *MIR172* durante a infecção por *A. brassicicola*. Os resultados obtidos sugerem que *DRB3* e *DRB4* são bons candidatos a serem explorados durante infecções fúngicas, uma vez que já foi demonstrada sua participação em mecanismos de defesa de plantas. Além disso, *DRB5* foi expresso diferencialmente em ambos os patossistemas, o que pode representar uma nova função para essa proteína, visto que sua função ainda permanece indefinida.

Palavras-chave: *Alternaria brassicicola*. *Colletotrichum higginsianum*. microRNAs. RT-qPCR.

ABSTRACT

The Double-stranded RNA binding domain proteins (dsRBPs) were characterized in eukaryotes and prokaryotes and are involved in all aspects of RNA biology, including synthesis, transport, processing, translation and degradation. *Arabidopsis thaliana* genome encodes five Double-stranded RNA binding (DRB) proteins, a family of dsRBPs, denominated from DRB1 to DRB5. The DRBs are characterized by two double stranded RNA binding domains at the N-terminal end and are involved in the biogenesis of small RNAs, especially in the pathway of microRNAs (miRNAs) and trans-acting siRNA (tasiRNAs). Previous studies have shown that some DRBs proteins are involved in responses to viral and bacterial infection. DRB3 participates in methylation-mediated defense against DNA viruses, while DRB4 alters its subcellular location to interact with viral RNA, controlling infection. Besides that, DRB4 is also required by resistance mechanisms during bacterial disease. However, the DRBs were not explored during fungal diseases. Fungi play a dominant role among phytopathogens causing devastating epidemics for plant species and are classified by their lifestyle as necrotrophic, biotrophic and hemibiotrophic. For this reason, this study aims to investigate the possible involvement of DRBs in *A. thaliana* infected by the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola* and by the hemibiotrophic fungus *Colletotrichum higginsianum*. We analyzed the gene expression of the DRBs and some miRNAs from *A. thaliana* ecotype Col-0 after the inoculation with the *A. brassicicola* strain CBS 125088 and *C. higginsianum* strain IMI 349063. Plants were cultivated in growth chambers and leaves of adult plants from three biological replicates were collected from infected and control groups after 6, 12, 24 and 48 hours of the inoculation. Total RNA was extracted and the reverse transcription was subsequently carried out. The relative expression was analysed employing *Actin* and *Ubiquitin* as reference genes. In plants infected with *A. brassicicola*, were also analyzed the expression of the miRNA genes *MIR164*, *MIR169* and *MIR172*, using *MIR159* and *MIR396* as reference genes. Results showed that *DRB1*, *DRB3*, *DRB4* and *DRB5* were differentially expressed between infected and control plants in some evaluation points during *A. brassicicola* infection, and *DRB3*, *DRB4* and *DRB5* were modulated during *C. higginsianum* infection. Besides that, a modulation was found in the *MIR169* and *MIR172* gene expression during *A. brassicicola* infection. The results suggest that *DRB3* and *DRB4* are good candidates to be explored during fungal diseases, since they have already been demonstrated to participate in plant defense mechanisms. In addition, *DRB5* was differentially expressed in both pathosystems, which may represent a new function for this protein, since its role is still undefined.

Keywords: *Alternaria brassicicola*. *Colletotrichum higginsianum*. microRNAs. RT-qPCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura gênica dos membros da família <i>DRB</i> em <i>A. thaliana</i>	18
Figura 2 - Principais etapas da biogênese de microRNAs (miRNAs) em plantas.	20
Figura 3 - Ciclo da doença causada por fungos do gênero <i>Alternaria sp.</i>	27
Figura 4 - Ciclo da doença causada por <i>C. higginsianum</i>	28
Figura 5 - Delineamento experimental de <i>A. thaliana</i> infectada com <i>A. brassicicola</i> e <i>C. higginsianum</i>	35
Figura 6 - Sintomas das doenças da mancha negra e antracnose em <i>A. thaliana</i>	42
Figura 7 - Expressão relativa dos genes <i>DRBs</i> em <i>A. thaliana</i> nos grupos controle e infectado com <i>A. brassicicola</i>	44
Figura 8 - Perfil da expressão relativa dos genes <i>DRBs</i> em <i>A. thaliana</i> nos grupos controle e infectado com <i>C. higginsianum</i>	46
Figura 9 - Valores médios de estabilidade da expressão (M) dos genes de referência para as análises de miRNAs após as análises pelo software geNorm.	47
Figura 10 - Expressão relativa de miRNAs candidatos em <i>A. thaliana</i> nos grupos controle e infectado com <i>A. brassicicola</i>	48
Figura 11 - Expressão gênica dos cinco genes <i>DRBs</i> em <i>A. thaliana</i> infectada com <i>B. cinerea</i>	50
Figura 12 - Expressão gênica dos cinco genes <i>DRBs</i> em <i>A. thaliana</i> infectada com <i>E. orontii</i>	51
Figura 13 - Expressão gênica dos cinco genes <i>DRBs</i> em <i>A. thaliana</i> infectada com <i>P. infestans</i>	52
Figura 14 – Estágios do processo de infecção de <i>A. brassicicola</i> e <i>C. higginsianum</i> e resultados de expressão gênica das <i>DRBs</i> e <i>miRNAs</i> em 6, 12, 24 e 48 horas após a inoculação.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências dos iniciadores utilizados nas reações de qPCR.	38
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGO	ARGONAUTA, do inglês “ <i>ARGONAUTE</i> ”
cDNA	DNA complementar, do inglês “ <i>complementary DNA</i> ”
Cq	Ciclo de quantificação, do inglês “ <i>Quantification cycles</i> ”
DAMP	Padrão molecular associado ao dano, do inglês “ <i>Damage Associated Molecular Patterns</i> ”
DCL	do inglês “ <i>DICER-LIKE</i> ”
DRB	Proteína ligante à RNA dupla fita, do inglês “ <i>Double stranded RNA binding</i> ”
dsRBPs	Proteínas com domínio de ligação à RNA dupla fita, do inglês “ <i>Double stranded RNA binding domain proteins</i> ”
ETI	Imunidade desencadeada por efêtor, do inglês “ <i>Effector triggered immunity</i> ”
Hai	Horas após a inoculação
HYL1	Proteína Folhas hiponásticas 1, do inglês “ <i>HYPONASTIC LEAVES 1</i> ”
miRISC	Complexo RISC carregado com miRNA, do inglês “ <i>miRNAs loaded into the RISC</i> ”
miRNA	microRNA
PAMP	Padrão molecular associado ao patógeno, do inglês “ <i>Pathogen associated molecular pattern</i> ”
Pre-miRNA	precursor de miRNA
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões, do inglês “ <i>Pattern recognition receptor</i> ”
PTI	Imunidade desencadeada por PAMP, do inglês “ <i>pattern triggered immunity</i> ”
qPCR	PCR quantitativa em tempo real, do inglês “ <i>quantitative real-time PCR</i> ”
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA, do inglês “ <i>RNA induced silencing complex</i> ”
RNAi	RNA de interferência
RT-qPCR	Transcrição reversa seguida de PCR quantitativa, do inglês “ <i>Reverse Transcription followed by quantitative PCR</i> ”
siRNA	Pequeno RNA de interferência, do inglês “ <i>small interfering RNA</i> ”
tasiRNA	Pequeno RNA de interferência de ação em trans, do inglês “ <i>trans acting small interfering RNA</i> ”

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	PROTEÍNAS DRBs	15
2.2	VIA DE miRNAs.....	18
2.3	INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO.....	21
2.4	INFECÇÃO FÚNGICA	24
2.4.1	<i>Alternaria brassicicola</i>.....	26
2.4.2	<i>Colletotrichum higginsianum</i>	28
2.5	<i>Arabidopsis thaliana</i> COMO ORGANISMO MODELO	29
2.6	BANCO DE DADOS PÚBLICOS COMO FERRAMENTA DE ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	30
3	JUSTIFICATIVA	32
4	HIPÓTESE.....	33
5	OBJETIVOS	33
5.1	Objetivo geral	33
5.2	Objetivos específicos	33
6	MATERIAL E MÉTODOS	34
6.1	MATERIAL VEGETAL	34
6.2	INOCULAÇÃO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	34
6.3	EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL.....	35
6.4	Síntese de cDNA e pcr quantitativa.....	36
6.4.1	Síntese de cDNA poli-T	36
6.4.2	Síntese de cDNA poli-T + stem-loop	36
6.4.3	PCR quantitativa em Tempo Real	37
6.4.4	Seleção de genes de referência para análise de miRNAs.....	39
6.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39

6.6	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS ÀS DOENÇAS FÚNGICAS UTILIZANDO BANCO DE DADOS PÚBLICOS	40
7	RESULTADOS	42
7.1	INFECÇÃO FUNGICA	42
7.2	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS PROTEÍNAS DRBs EM <i>A. thaliana</i> INFECTADA COM <i>A. brassicicola</i>	42
7.3	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS PROTEÍNAS DRBs EM <i>A. thaliana</i> INFECTADA COM <i>C. higginsianum</i>	44
7.4	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE miRNAs DURANTE INFECÇÃO POR <i>A. brassicicola</i>	46
7.5	ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DAS DRBs EM BANCO DE DADOS PÚBLICOS.....	49
8	DISCUSSÃO	53
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
	REFERÊNCIAS.....	61
	APÊNDICE A – Sequências gênicas utilizadas para a projeção dos iniciadores	70
	APÊNDICE B – Expressão relativa dos genes <i>DRB1</i>, <i>DRB2</i>, <i>DRB3</i>, <i>DRB4</i>, <i>DRB5</i>, <i>MIR164</i>, <i>MIR169</i> e <i>MIR172</i> em <i>A. thaliana</i> durante infecção por <i>A. brassicicola</i>.	80
	APÊNDICE C – Expressão relativa dos genes <i>DRB1</i>, <i>DRB2</i>, <i>DRB3</i>, <i>DRB4</i> e <i>DRB5</i> em <i>A. thaliana</i> durante infecção por <i>C. higginsianum</i>	81

1 INTRODUÇÃO

As proteínas ligantes ao RNA de dupla-fita, ou *Double-stranded RNA binding domain proteins* (dsRBPs), foram isoladas em diversos organismos, como vírus, procariontes e eucariontes. Elas estão envolvidas em todos os aspectos da biologia do RNA, incluindo síntese, transporte, processamento, tradução e degradação de RNA (EAMENS; KIM; WATERHOUSE, 2012). Em *Arabidopsis thaliana*, foram identificadas cinco proteínas *Double-stranded RNA-Binding* (DRB), denominadas de DRB1 a DRB5, que fazem parte de uma família de dsRBPs encontradas em plantas. Essas proteínas possuem dois motivos ligantes, sendo um à molécula RNA de fita dupla e outro de interação entre proteínas.

DRB1, também chamada de HYL1, foi a primeira DRB a ser descoberta e é a mais estudada. Essa tem origem nuclear, onde interage com a DICER-LIKE1 (DCL1), auxiliando-a nas clivagens dos transcritos precursores de microRNAs (miRNAs) e, subsequentemente, formando os miRNAs maduros (HAN et al., 2004). Os miRNAs são uma classe de pequenos RNAs não codificantes endógenos, que regulam negativamente a expressão dos seus genes alvos. Sua biogênese inclui a transcrição de genes próprios, processamento de um precursor, metilação e montagem do complexo de silenciamento induzido por miRNA (miRISC). Os miRNAs regulam o mRNA alvo com base na complementaridade da sequência, por meio da clivagem do mRNA alvo ou da inibição da tradução (SONG et al., 2019).

DRB4, assim como a DRB1, é uma proteína nuclear bastante descrita. De forma semelhante à DRB1, DRB4 interage com DCL4, no processamento de *trans-acting* siRNAs (tasiRNAs) (NAKAZAWA et al., 2007). Além disso, DRB4 também está envolvida em mecanismos de defesa contra infecções virais e bacterianas (ZHU et al., 2013). DRB2 também apresenta localização nuclear e auxilia no processamento específico de miRNAs no meristema apical e possui um papel antagônico e sinérgico à DRB1 e DRB4 na produção de siRNAs (EAMENS et al., 2012; PÉLISSIER et al., 2011). Embora as proteínas acima referidas já tenham suas funções bem estabelecidas, DRB3 e DRB5 ainda possuem poucas informações até o momento. *DRB3* e *DRB5* são expressas no citoplasma, ao contrário de *DRB1*, *DRB2* e *DRB4* e, apesar de não estarem envolvidas no processamento de miRNA, podem contribuir para silenciar transcritos alvo de miRNAs associados à DRB2 (EAMENS; KIM; WATERHOUSE, 2012). Além disso, também já foi verificada a participação de DRB3 durante a defesa contra DNA viral (RAJA et al., 2014).

Apesar da participação das DRBs em mecanismos de defesa contra organismos virais e bacterianos já ter sido estabelecida, ainda não se tem relatos do envolvimento dessas proteínas em resposta a infecções fúngicas, embora esses sejam os principais patógenos de plantas. Levando-se em consideração a falta de conhecimento acerca da participação das DRBs durante interação planta-fungo, o presente trabalho visou analisar a expressão dos genes DRBs em *A. thaliana* durante infecção com os fungos fitopatógenos *Alternaria brassicicola* e *Colletotrichum higginsianum*.

Devido à disponibilidade do genoma completo, uma extensa coleção de mutantes e à facilidade de análise genética, *Arabidopsis thaliana* se tornou um importante modelo de hospedeiro para estudos abordando as interações entre plantas e patógenos.

Alternaria brassicicola é causador da doença da mancha negra, uma das doenças fúngicas mais comuns e destrutivas de espécies da família *Brassicaceae*, incluindo *A. thaliana* (POCHON et al., 2012). Essa espécie necrotrófica utiliza uma variedade de fatores de patogenicidade durante todo o processo de infecção e matam o tecido hospedeiro à medida que colonizam e se desenvolve a partir do conteúdo de células mortas (BELMAS et al., 2018). As pesquisas relacionadas a *A. brassicicola* concentram-se principalmente nas respostas das plantas à infecção, análise de aspectos bioquímicos da patogênese, caracterização fenotípica de mutantes naturais e estudos de expressão gênica para descobrir genes candidatos associados à patogênese (CHO, 2015).

O gênero *Colletotrichum* engloba inúmeros fungos patogênicos causadores da doença antracnose em inúmeras espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas (O'CONNELL et al., 2004). A interessante estratégia de infecção hemibiotrófica de *C. higginsianum* e a facilidade do seu cultivo axênico, tornou-a uma das espécies mais bem estudadas desse gênero. *C. higginsianum* desenvolve uma série de estruturas de infecção especializadas, como tubos germinativos, apressórios, hifas biotróficas primárias e hifas necrotróficas secundárias (YAN et al., 2018). Atualmente tanto o genoma quanto o transcrito desta espécie encontram-se disponíveis (ZAMPOUNIS et al., 2016). Adicionalmente, *C. higginsianum* é capaz de infectar a maioria dos ecótipos de *A. thaliana* (SHIMADA et al., 2006). Por essas razões, o patossistema *C. higginsianum* – *Arabidopsis* tornou-se um modelo atraente para pesquisas acerca das interações planta-fungo patogênico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PROTEÍNAS DRBs

As proteínas ligantes ao RNA de fita dupla (dsRNA), do inglês *DOUBLE-STRANDED RNA BINDING DOMAIN PROTEINS* (dsRBPs), foram isoladas em diversos organismos e estão envolvidas em todos os aspectos da biologia de RNAs, como silenciamento de genes através de vias de interferência por RNA, processamento de RNA, regulação da tradução, transporte e processamento de RNA e localização de mRNA (EAMENS; KIM; WATERHOUSE, 2012).

No organismo modelo *Arabidopsis thaliana*, foi identificada uma família de proteínas dsRBPs denominada *DOUBLE-STRANDED RNA-BINDING* (DRBs) a qual é composta por cinco genes. As DRBs possuem tamanho de 35-40 kDa e formam dobras do tipo α - β - β - α , onde a molécula de RNA interage com duas α -hélices (TIAN et al., 2004). Elas dispõem de dois motivos ligantes à RNAs de fita dupla na porção amino-terminal, que consistem de aproximadamente 70 resíduos de aminoácidos e nenhum motivo ligante a dsRNA na região carboxi-terminal (CURTIN et al., 2008; RYTER, 1998; ST JOHNSTON et al., 1992). Essas proteínas de ligação ao dsRNA de *Arabidopsis* são estruturalmente semelhantes às proteínas de ligação ao dsRNA dos animais que interagem com as proteínas DICER ou DROSHA (NAKAZAWA et al., 2007).

O primeiro membro da família a ser identificado foi a proteína HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1), também designada como dsRNA-BINDING PROTEIN 1 (DRB1) (HAN et al., 2004). Posteriormente, outras quatro proteínas com sequências homólogas à DRB1 foram identificadas em *A. thaliana*, sendo denominadas DRB2, DRB3, DRB4 e DRB5, respectivamente.

O primeiro mutante para DRB1 foi identificado por Lu e Fedoroff (2000) e é caracterizado pela estatura reduzida, florescimento tardio com fertilidade reduzida, hiponastia foliar, menor taxa de crescimento radicular e resposta gravitrópica alterada da raiz. Além disso, exibe menor sensibilidade à auxina e citocinina e hipersensibilidade ao ácido abscísico (LU; FEDOROFF, 2000). O fenótipo do mutante *drb1* apresenta raízes, folhas e flores anormais, sugerindo que o gene possui uma função na maioria ou em todos os tecidos vegetais. Sendo assim, DRB1 desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de *Arabidopsis* ao longo do ciclo de vida da planta. Adicionalmente, análises realizadas com a

região promotora de *DRB1* fusionada a β -glucuronidase (*GUS*) mostraram que essa proteína possui origem nuclear e sua extremidade C-terminal possui seis repetições quase perfeitas de uma sequência de 28 aminoácidos (LU; FEDOROFF, 2000).

DRB1 participa da biogênese de alguns microRNAs (miRNA) (HAN et al., 2004; SZARZYNSKA et al., 2009), auxiliando a proteína DICER-LIKE1 (DCL1) a selecionar e processar com precisão um pequeno segmento específico de dsRNA, em um duplex intermediário miRNA/miRNA*, a partir de um precursor de miRNA (pré-miRNA) (DONG; HAN; FEDOROFF, 2008; KURIHARA; TAKASHI; WATANABE, 2005). Para estabilizar os pequenos RNAs, uma metiltransferase HUA ENHANCER 1 (HEN1) transfere um grupo metil para os terminais 3' de cada cadeia do duplex miRNA/miRNA* formado. Após a separação do duplex, DRB1 direciona a fita guia do miRNA para a proteína ARGONAUTE1 (AGO1), formando o complexo RISC carregado com miRNA (miRISC) (EAMENS et al., 2012; VAUCHERET, 2008). Um estudo apontou que as proteínas DRBs podem auxiliar no modo de atuação do complexo miRISC, por meio de miRNAs processados pela DCL1 ligada à DRB1 ou DRB2 (REIS et al., 2015). De modo geral, miRNAs são processados por DCL1 ligada à DRB1, e são direcionados para a AGO1 para formar o complexo miRISC, que reprime a expressão dos transcritos alvo através da clivagem transcricional. Contudo, DRB2 possui interações e atividades semelhantes às da DRB1, entretanto, os miRNAs processados pela ligação de DCL1 e DRB2 reprimem a tradução de mRNAs, possivelmente via inativação da atividade de clivagem do AGO (REIS et al., 2015). De modo semelhantemente à DRB1, a proteína DRB4 possui uma ação conjunta à enzima DCL4 na biogênese de outra classe de siRNAs, os *trans-acting* siRNAs (tasiRNAs) (ADENOT et al., 2006; NAKAZAWA et al., 2007).

Assim como DRB1 e DRB4, DRB2 possui localização nuclear e participa no processamento específico de miRNAs no meristema apical (EAMENS et al., 2012). Estudos afirmam que DRB2 apresenta um papel antagônico às DRB1 e DRB4 na biogênese de pequenos RNAs (EAMENS et al., 2012; PÉLISSIER et al., 2011; REIS et al., 2015). Na produção de siRNAs dependente da RNA Polimerase IV, DRB2 é considerada antagonista à DRB4, e o sinergismo entre essas proteínas ocorre na biogênese de miRNAs dependentes de DRB4 (PÉLISSIER et al., 2011). Em relação à DRB1, a DRB2 é considerada antagonista e sinérgica na biogênese de miRNA específicos (EAMENS et al., 2012). Essa interação entre as proteínas sugere um mecanismo de controle do acúmulo de RNAs endógenos durante o

desenvolvimento de *A. thaliana* através da ação coletiva dos três membros da família DRB com localização nuclear (EAMENS et al., 2012).

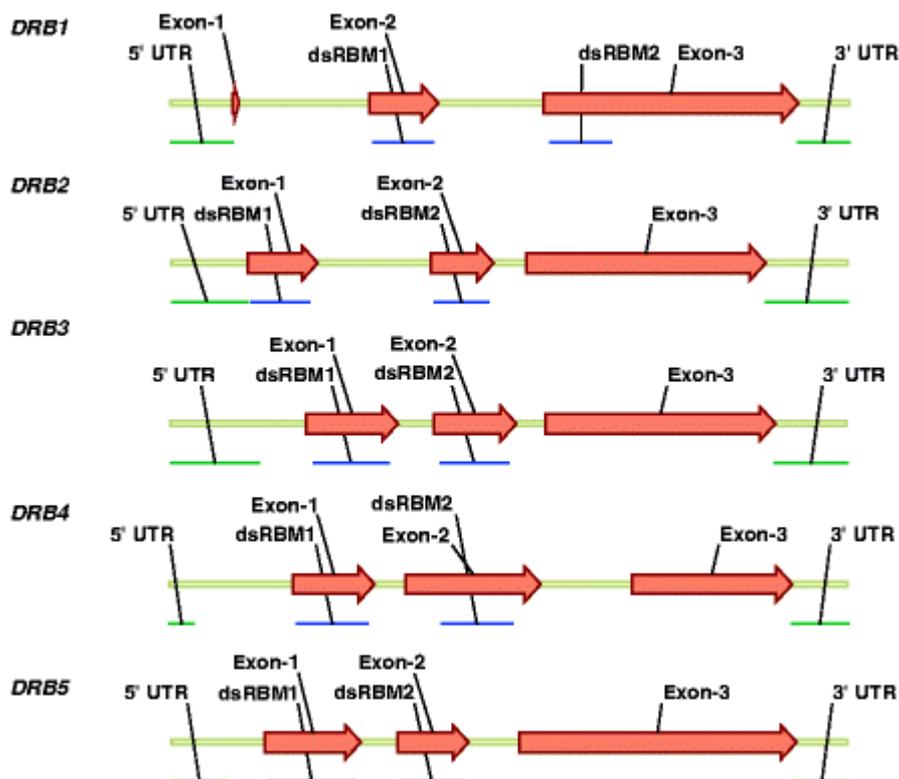
Estudos com mutante *drb2* mostram alterações na morfologia foliar. O fenótipo do mutante possui folhas planas e mais serrilhadas, verde-azuladas e ovoides quando comparadas às plantas selvagens (CURTIN et al., 2008). Quando analisada a especificidade tecidual da expressão de *DRB2* em análises do seu promotor fusionado ao gene repórter *GUS*, observou-se atividade limitada ao desenvolvimento de anteras e pólen, bem como ao amadurecimento e germinação de sementes (CURTIN et al., 2008). Contudo, apesar de *DRB2* estar localizada no núcleo, análises de mutantes triplos (*drb2,3,4* e *drb2,3,5*) e quádruplo (*drb1,2,3,5*) demonstram que, assim como *DRB3*, *DRB4* e *DRB5*, essa proteína não desempenha nenhum papel na biogênese da maioria dos miRNAs (CURTIN et al., 2008).

Ao contrário de *DRB1*, *DRB2* e *DRB4*, a localização celular e função de *DRB3* e *DRB5* ainda não estão totalmente estabelecidas. Apesar de alguns trabalhos afirmarem que essas proteínas são exclusivamente encontradas no citoplasma (EAMENS; KIM; WATERHOUSE, 2012), em estudos mais recentes elas foram localizadas tanto no citoplasma como no núcleo (BARTON et al., 2017). As análises de localização celular utilizando o gene repórter *GUS* fusionado ao promotor dos genes *DRBs* mostram uma maior expressão de *DRB3* na região do meristema apical (SAM), e níveis mais baixos no restante dos tecidos vegetais. Já *DRB5* possui atividade restrita ao SAM e região apical circundante e a botões de flores imaturos, desaparecendo após o amadurecimento floral (CURTIN et al., 2008). Quanto à sua função, sugere-se que não estejam envolvidas diretamente no processamento de miRNAs, mas auxiliem no silenciamento de transcritos direcionados por miRNAs associados à *DRB2* (EAMENS; KIM; WATERHOUSE, 2012; RAJA et al., 2014). Estudos demonstram que *DRB3* também participa dos mecanismos de defesa antiviral mediada por metilação, juntamente com *DCL3* e *AGO4* (RAJA et al., 2014). Contudo, as funções da *DRB5* ainda necessitam ser melhor elucidadas.

Apesar das *DRBs* possuírem sequências homólogas, análises evolutivas baseadas na similaridade das sequências aminoacídicas, demonstram que *DRB2*, *DRB3* e *DRB5* formam um único clado filogenético, sendo mais relacionado à *DRB4* do que à *DRB1* (CLAVEL et al., 2016; EAMENS et al., 2012). Também é possível observar essa diferença em nível de estrutura genômica. Todos os cinco genes *DRBs* possuem três éxons, separados por dois íntrons e flanqueados por uma região 5' e 3' não traduzidas (Figura 1). Contudo, os primeiros éxons de *DRB2*, *DRB3*, *DRB4* e *DRB5* codificam dois motivos N-terminais ligantes a RNA de

fita dupla, ao contrário de *DRB1*, onde o primeiro éxon da *DRB1* não codifica o motivo ligante a RNA dupla-fita (EAMENS; CURTIN; WATERHOUSE, 2011). Isso sugere que *DRB2*, *DRB3* e *DRB5* possam ter evoluído a partir da *DRB4* (EAMENS; KIM; WATERHOUSE, 2012). Além disso, os motivos ligantes à RNA das DRBs além de permitirem a interação com substratos de dsRNA, também funcionam como um domínio de interação proteína-proteína (EAMENS; CURTIN; WATERHOUSE, 2011).

Figura 1 - Estrutura gênica dos membros da família *DRB* em *A. thaliana*.



As regiões 5' e 3' UTR são representadas por linhas verdes, os éxons por setas laranjas e os dsRBMs por linhas azuis. Fonte: Adaptado de Eamens *et al.* (2011).

2.2 VIA DE miRNAs

O silenciamento de RNA é um mecanismo regulador que controla a expressão gênica e participa da defesa contra patógenos em fungos, plantas e animais (ZHANG *et al.*, 2019). Esse mecanismo envolve o direcionamento específico de sequências homólogas e pode ocorrer nos níveis transcricional e pós-transcricional, conhecido como silenciamento gênico transcricional (TGS) e pós-transcricional (PTGS), do inglês *transcriptional* e *post-*

transcriptional gene silencing. Em nível transcricional, ocorre a modificação do DNA por metilação de DNA direcionada por RNA (RdDM), enquanto pós-transcricionalmente, há a degradação do RNA mensageiro ou o bloqueio da tradução de transcritos de RNA homólogos (ZHANG et al., 2019).

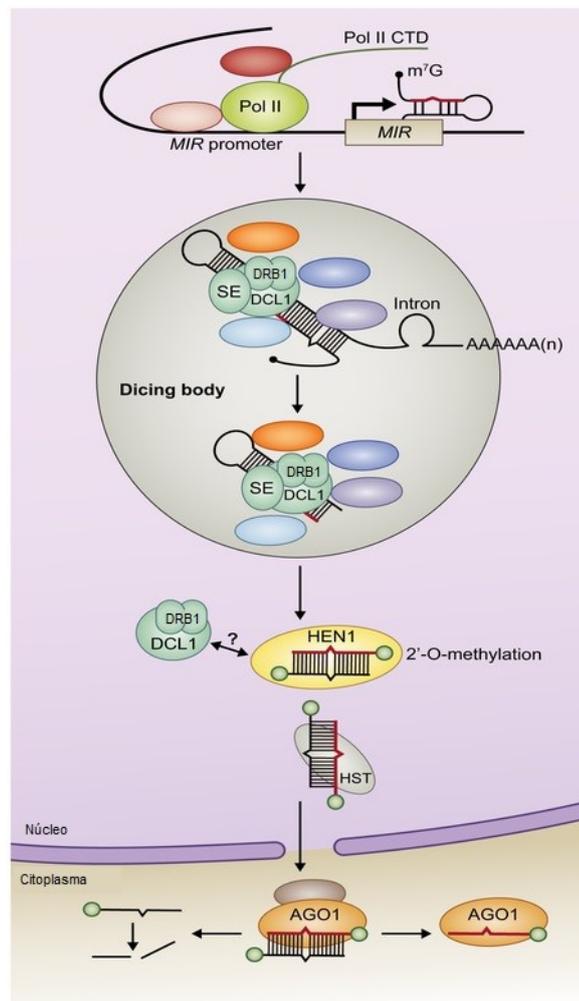
Em eucariontes, os pequenos RNAs estão entre os principais reguladores da expressão gênica. Eles surgem após o processamento de RNAs mais longos e possuem, geralmente, de 20 a 24 nucleotídeos (nt) de comprimento (ERDMANN; BARCISZEWSKI, 2011). Em plantas, os pequenos RNAs podem ser classificados em diferentes classes, como microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs de interferência (siRNAs), siRNAs de ação trans (tasiRNA) e pequenos RNAs naturais antissenso (nat-siRNAs) (KULCHESKI; MARGIS, 2017).

Como parte do mecanismo de RNAi, os miRNAs são uma classe de pequenos RNAs endógenos, de 20 a 24 nucleotídeos de comprimento que atuam em uma série de processos biológicos, como crescimento, desenvolvimento e adaptação a diversos estresses. (REIS; EAMENS; WATERHOUSE, 2015). Eles são parcialmente complementares a uma ou mais moléculas alvo de RNA mensageiro (mRNA) e participam na regulação gênica pós-transcricional, através da repressão translacional e/ou na degradação de mRNA alvos (LI; ZHANG, 2016; RAHIMPOUR et al., 2019).

Em plantas, os genes de miRNAs são transcritos por uma enzima RNA polimerase do tipo II (JONES-RHOADES ET AL., 2006; LEE ET AL., 2004), gerando um longo transcrito de miRNA primário (pri-miRNA) que apresenta uma estrutura em formato de grampo (“*hairpin structure*”), e contém cap 5’ e cauda poli A na região 3’. No núcleo, uma enzima do tipo RNaseIII denominada DCL1 processa a maioria dos pri-miRNAs por clivagem sequencial. A estrutura em formato de grampo é clivada pela DCL1 (KURIHARA; TAKASHI; WATANABE, 2005), juntamente com a DRB1, gerando uma molécula precursora do miRNA maduro, denominada pré-miRNA. Esse processamento ocorre em um centro de processamento nuclear conhecido como corpo-D (FANG; SPECTOR, 2007). O pré-miRNA é novamente clivado pela DCL1 e origina uma dupla miRNA:miRNA* (KURIHARA; TAKASHI; WATANABE, 2005). Os dúplex miRNA:miRNA* processados possuem dois nucleotídeos não pareados na região 3’ de cada fita, tornando-os suscetíveis à degradação por exonucleases. Para estabilizar o dúplex miRNA:miRNA*, uma metiltransferase específica de sRNA, HUA ENHANCER 1 (HEN1), metila o excesso de nucleotídeos de cada fita dupla, prevenindo a degradação (YU et al., 2005). Então, o dúplex

miRNA:miRNA* é exportado para o citoplasma por uma proteína de membrana HASTY (HST), onde é separado e a fita guia do miRNA é incorporada a um Complexo de Silenciamento Induzido por RNA, RISC (do inglês, *RNA-induced silence complex*), onde uma proteína AGONAUTA1 (AGO1) irá clivar o mRNA alvo no meio do dúplice mRNA:miRNA (Figura 2).

Figura 2 - Principais etapas da biogênese de microRNAs (miRNAs) em plantas.



A transcrição do gene de miRNA (*MIR*) mediada por RNA polimerase II (Pol II) é regulada por múltiplos fatores de transcrição (TFs). A atividade de Pol II também é sujeita à fosforegulação no seu domínio C-terminal (CTD). Os precursores de miRNA são processados nos *Dicing bodies* pelo complexo *dicing*, composto principalmente por DCL1, DRB1 e SE. A interação do complexo *dicing* com HEN1 ainda não está clara (ponto de interrogação). HEN1 contribui para a montagem duplex de exportação de miRNA/miRNA*. Durante o carregamento do RISC, uma fita do duplex de miRNA é selecionada como fita guia (vermelha) e incorporada no AGO1 para formar um RISC funcional, enquanto a outra fita (fita passageira) é removida e degradada. Fonte: Adaptado de Yu *et al.* (2017).

Os miRNAs de plantas regulam os genes-alvo no nível pós-transcricional por meio de dois mecanismos: clivagem de transcrição e repressão da tradução (YU; JIA; CHEN, 2017).

A clivagem de RNA guiada por miRNA ocorre em uma posição precisa no mRNA alvo (LLAVE, 2002). A clivagem é realizada pelo domínio PIWI das proteínas AGO, que forma uma dobra semelhante à RNase H e exibe atividade de endonuclease (YU; JIA; CHEN, 2017). Após o corte, os fragmentos de clivagem 5'e 3' são subsequentemente degradados por exonucleases.

Por sua vez, a inibição da tradução mediada por miRNA é menos frequente do que a clivagem de transcritos. Enquanto a clivagem do mRNA alvo resulta em redução nos níveis dos transcritos, a repressão translacional leva a um acúmulo reduzido de proteínas traduzidas dos mRNAs alvos (SONG et al., 2019). Esse mecanismo pode ocorrer de modo que os miRNAs atuem na inibição do início da tradução ou dificultem o movimento dos ribossomos (YU; JIA; CHEN, 2017).

Um dos mecanismos que pode estar envolvido na seleção do modo de repressão translacional via miRNA são os membros da família DRB. Enquanto miRNAs gerados pela interação da DCL1 com DRB1 são necessários para a clivagem do mRNA, a interação da DRB2 com DCL1 e o seu envolvimento na via do miRNA orienta o miRISC a reprimir a tradução de mRNAs alvo, possivelmente via inativação da atividade de clivagem da AGO (REIS; EAMENS; WATERHOUSE, 2015; SONG et al., 2019).

2.3 INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO

Em seu ambiente natural, as plantas estão sob contínuo estresse biótico causado por organismos potencialmente patogênicos, incluindo bactérias, fungos e vírus (SPOEL; JOHNSON; DONG, 2007). Esses patógenos podem ser divididos em biotróficos, hemibiotróficos e necrotróficos. Biotróficos são os organismos patogênicos que penetram em células hospedeiras, onde obtêm os nutrientes necessários para o crescimento e reprodução do seu ciclo de vida. Outros patógenos possuem uma fase necrotrófica onde, através do uso de enzimas e toxinas degradadoras da parede celular, degradam e destroem as células hospedeiras, fazendo com que os nutrientes sejam liberados e possam ser metabolizados. Assim, os patógenos necrotróficos dependem de tecido hospedeiro morto para o seu

crescimento, nutrição e reprodução (DICKINSON, 2003; SPOEL; JOHNSON; DONG, 2007). Existem ainda organismos que apresentam ambas as estratégias em seu ciclo de vida e são denominados hemibiotróficos. Esses podem ser biotróficos em um estágio inicial do ciclo infeccioso e, subsequentemente, causam danos mais significativos, podendo levar à morte celular, consistindo em um estágio necrotrófico (DICKINSON, 2003; SPOEL; JOHNSON; DONG, 2007).

Apesar dos micro-organismos fitopatogênicos quase sempre ocuparem nichos extracelulares, os nutrientes necessários para o seu crescimento são derivados das células do hospedeiro (DODDS; RATHJEN, 2010). Assim, a interação molecular ocorre no citoplasma e organelas do hospedeiro. Em plantas, existem diversos mecanismos de respostas contra organismos potencialmente patogênicos, que envolvem uma extensa reprogramação transcricional da expressão gênica de defesa (CAMARGO-RAMÍREZ; VAL-TORREGROSA; SAN SEGUNDO, 2018). Entre esses mecanismos, associa-se o início da imunidade através do reconhecimento de Padrões Moleculares Associados aos Patógenos, do inglês *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). Os PAMPs são moléculas de epítomos invariantes, que não estão presentes no hospedeiro, mas são reconhecidas por ele e são fundamentais para a interação dos diferentes agentes patogênicos (SCHWESSINGER; ZIPFEL, 2008). A detecção ocorre através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) codificados pelo hospedeiro, resultando em uma resposta de defesa conhecida como imunidade desencadeada por PAMP ou PTI (BARI; JONES, 2009; CAMARGO-RAMÍREZ; VAL-TORREGROSA; SAN SEGUNDO, 2018). Entre os componentes da PTI, existe a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), a ativação de processos de fosforilação/desfosforilação proteica, o reforço da parede celular através da deposição de lignina e acúmulo de compostos antimicrobianos (CAMARGO-RAMÍREZ; VAL-TORREGROSA; SAN SEGUNDO, 2018). As plantas também respondem a moléculas endógenas liberadas durante a invasão de patógenos, como parede celular ou fragmentos cuticulares, chamados padrões moleculares associados ao perigo, do inglês *danger-associated molecular patterns* (DAMPs), também conhecidos como padrões moleculares associados ao dano (*damage-associated molecular patterns*) (DODDS; RATHJEN, 2010).

Outro mecanismo encontrado em plantas envolve o reconhecimento por receptores intracelulares de moléculas de virulência de patógenos, chamados efetores. Esse reconhecimento induz a imunidade acionada por efector, *effector-triggered immunity*, (ETI) (DODDS; RATHJEN, 2010). Em contraste com os PAMPs, os efetores são

caracteristicamente variáveis e dispensáveis, levando a uma dinâmica co-evolucionária entre a planta e o patógeno. Apesar de algumas funções de PRR serem amplamente conservadas entre as famílias de patógenos, geralmente é encontrada uma grande diversidade de receptores de ETI e efetores de patógenos dentro e entre as espécies (DODDS; RATHJEN, 2010).

Os hospedeiros também apresentam genes que estão relacionados à resistência e respostas de defesa contra os patógenos, baseados na percepção de efetores, sendo designados como genes de resistência (R). A resistência desencadeada pela proteína R é normalmente específica e somente é eficaz contra os patógenos que expressam o efector reconhecido pela proteína R (ANAND et al., 2012).

Dentre os diversos mecanismos específicos desenvolvidos pelas plantas para combater uma infinidade de micro-organismos patogênicos, inclui-se o silenciamento mediado por RNA ou também conhecido por RNA de interferência (RNAi). Esse controle pode ocorrer de forma transcricional, por meio da metilação de DNA direcionada por RNA, do inglês RNA-directed DNA methylation (RdDM) ou pós-transcricionalmente, através de várias vias mediadas por miRNAs ou siRNAs (RAJA et al., 2014). Os miRNAs são importantes moléculas reguladoras, que podem ser induzidas ou reprimidas em resposta à infecção por patógenos e atuam no nível pós-transcricional. Dessa forma, controlam negativamente a expressão gênica, desencadeando a clivagem ou repressão traducional de seus transcritos alvo (BRODERSEN et al., 2008; LLAVE, 2002). Assim, as plantas contam com o silenciamento via RNAi como uma defesa eficaz contra organismos invasores (DING; VOINNET, 2007).

A importância dos miRNAs no desenvolvimento de plantas e em respostas a estresses abióticos é bem descrita (BREAKFIELD et al., 2012; NAG; JACK, 2010; RUBIO-SOMOZA; WEIGEL, 2011). Com relação à participação dos miRNAs em mecanismos de defesa contra patógenos vários estudos estão sendo desenvolvidos.

A repressão da sinalização de auxina mediada por *MIR393* aumenta a resistência a patógenos bacterianos (NAVARRO et al., 2006). Também foi reconhecida a participação dos miRNAs em infecções fúngicas, onde a superexpressão de *MIR858* e *MIR396* resulta em maior susceptibilidade à infecção, enquanto a inibição da sua atividade confere maior resistência à infecção por patógenos necrotróficos e hemibiotróficos (CAMARGO-RAMÍREZ; VAL-TORREGROSA; SAN SEGUNDO, 2018; SOTO-SUÁREZ et al., 2017). Jin e colaboradores (2012) observaram indução de *MIR169* em folhas de tomates infectadas por *Botrytis* e consequente repressão do seu gene alvo, *NF-YA5*, sugerindo que a indução de

Sly-MIR169 pode promover a tolerância ao estresse das plantas. Evidências demonstram que *MIR773a* atua como um regulador negativo da imunidade de *Arabidopsis* contra patógenos fúngicos necrotróficos e hemibiotróficos (SALVADOR-GUIRAO et al., 2018). A redução dos níveis de *MIR398b* e o subsequente aumento na expressão dos seus alvos (CSD1 e Nod19) em folhas de feijão infectadas por *Sclerotinia sclerotiorum* demonstram a participação desse miRNA em respostas vegetais contra fungos patogênicos (NAYA et al., 2014). A superexpressão de *MIR164a*, *MIR168a* e *MIR393* em linhagens transgênicas de alho (*Allium sativum* L.) infectadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* (FOC), promove um menor crescimento dos fungos e uma maior expressão de genes responsivos à defesa, indicando que esses miRNAs desempenham um papel crucial na resistência à infecção por FOC (CHAND et al., 2017).

Alguns estudos demonstram também a ação das proteínas DRBs como parte dos mecanismos de defesa contra infecções virais e bacterianas (ZHU et al., 2013). Segundo Raja et al. (2014), DRB3 é a principal proteína DRB envolvida na defesa antiviral mediada por metilação. Além disso, DRB4 altera a sua localização subcelular durante a infecção por vírus, movendo-se do núcleo para o citoplasma, onde interage especificamente com o RNA viral para controlar a infecção (MUSIDLAK; NAWROT; GOŹDZICKA-JÓZEFIAK, 2017). Em plantas infectadas por patógenos bacterianos, DRB4 também é necessária na estabilidade de proteínas de resistência, sugerindo um papel universal na via de sinalização mediada por genes R (ZHU et al., 2013). Em relação às infecções fúngicas, a participação das DRBs ainda não foi abordada.

2.4 INFECÇÃO FÚNGICA

A capacidade de parasitismo e fitopatogenicidade evoluíram independentemente em diversos grupos biológicos, inclusive, em bactérias, fungos e protistas. Dentre esses, os fungos constituem um grupo altamente versátil de organismos que obtiveram sucesso ao ocupar a maioria dos habitats naturais. A grande maioria dos fungos são estritamente saprófitos, onde <10% das, aproximadamente, 100.000 espécies fúngicas conhecidas são capazes de colonizar plantas, sendo as espécies patogênicas uma parcela ainda menor (KNOGGE, 1996; KUBICEK; STARR; GLASS, 2014). Contudo, os fungos desempenham o papel dominante entre os organismos fitopatogênicos, por serem causadores de epidemias devastadoras, além

de resultarem em perdas persistentes e significativas para as espécies vegetais, tornando-os assim um problema econômico, principalmente para a agricultura.

Os fungos, assim como os outros organismos patogênicos, podem ser classificados como necrotróficos, biotróficos e hemibiotróficos. Existem ainda espécies que não são fitopatogênicas *per se*, mas são considerados patógenos por apresentarem micotoxinas causadoras de doenças à saúde humana e sua presença pode causar perda econômica à cultura infectada (DICKINSON, 2003).

A potencialidade fúngica de produzir enzimas extracelulares capazes de degradar alguns compostos vegetais, dando origem ao processo infeccioso, pode estar vinculada à fitopatogenicidade (MARTINEZ et al., 2015). Os fitopatógenos produzem moléculas codificadas pelos genes *Avr* (avirulência) chamadas efetores, que são liberadas nas células vegetais durante o estágio inicial da infecção. Esses efetores podem alterar o estado fisiológico da planta hospedeira, facilitando a colonização de patógenos ou interromper a ativação das defesas da planta hospedeira (ANAND et al., 2012).

É possível observar diversos mecanismos de defesa das plantas contra os diferentes patógenos. Esses mecanismos podem ser estruturais e/ou bioquímicos e ambos podem ser formados pré e/ou pós à tentativa de penetração do patógeno (STANGARLIN et al., 2011). Os mecanismos estruturais são formados por barreiras físicas que impedem a penetração e/ou colonização do patógeno. Os mecanismos de defesa bioquímicos se referem às substâncias inibidoras do desenvolvimento do patógeno ou capazes de gerar condições adversas para a sobrevivência desses organismos nos tecidos do hospedeiro (STANGARLIN et al., 2011).

As proteínas DRBs estão envolvidas nos mecanismos de defesa vegetal contra vírus e bactérias. Contudo, ainda não foi identificada a sua participação em relação às infecções fúngicas. Por outro lado, no que diz respeito ao estudo de miRNAs, foram identificadas alterações na expressão de *MIR169*, *MIR393*, *MIR396*, *MIR773*, e *MIR858* quando analisados em plantas submetidas à infecções por fungos necrotróficos e hemibiotróficos, como citados anteriormente (CAMARGO-RAMÍREZ; VAL-TORREGROSA; SAN SEGUNDO, 2018; JIN; WU; XIAO, 2012; SALVADOR-GUIRAO et al., 2018; SOTO-SUÁREZ et al., 2017).

As infecções fúngicas são capazes de desencadear respostas de defesa vegetal que englobam os miRNAs, uma vez que estes atuam em inúmeras vias envolvidas na interação entre a planta e o patógeno, bem como, em passos consecutivos como por exemplo, a regulação de desequilíbrios hormonais das plantas infectadas (GUPTA et al., 2014). Infecções causadas por *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* em *Triticum aestivum* promovem uma indução

do *MIR408* o que sugere o provável desencadeamento da via da biossíntese de lignina como uma resposta da reação de hipersensibilidade para evitar a ruptura da epiderme (GUPTA et al., 2012). Já o patógeno *Botryosphaeria dothidea* ao infectar *Populus trichocarpa*, induz um aumento na expressão de diversos miRNAs, como *MIR156*, *MIR159*, *MIR164*, *MIR166*, *MIR168*, *MIR172*, *MIR319*, entre outros, envolvidos em processos celulares de defesa, incluindo morte celular programada, cascata de sinalização (fatores de transcrição) e vias metabólicas (ZHAO et al., 2012). A infecção causada por *Pythium aphanidermatum* em *Curcuma longa* L. promove repressão na expressão de *MIR164*, resultando em um aumento no nível de NAC, uma proteína envolvida na resposta imune das plantas, sugerindo o impedimento da resposta de hipersensibilidade e facilitar a infecção (CHAND et al., 2016).

2.4.1 *Alternaria brassicicola*

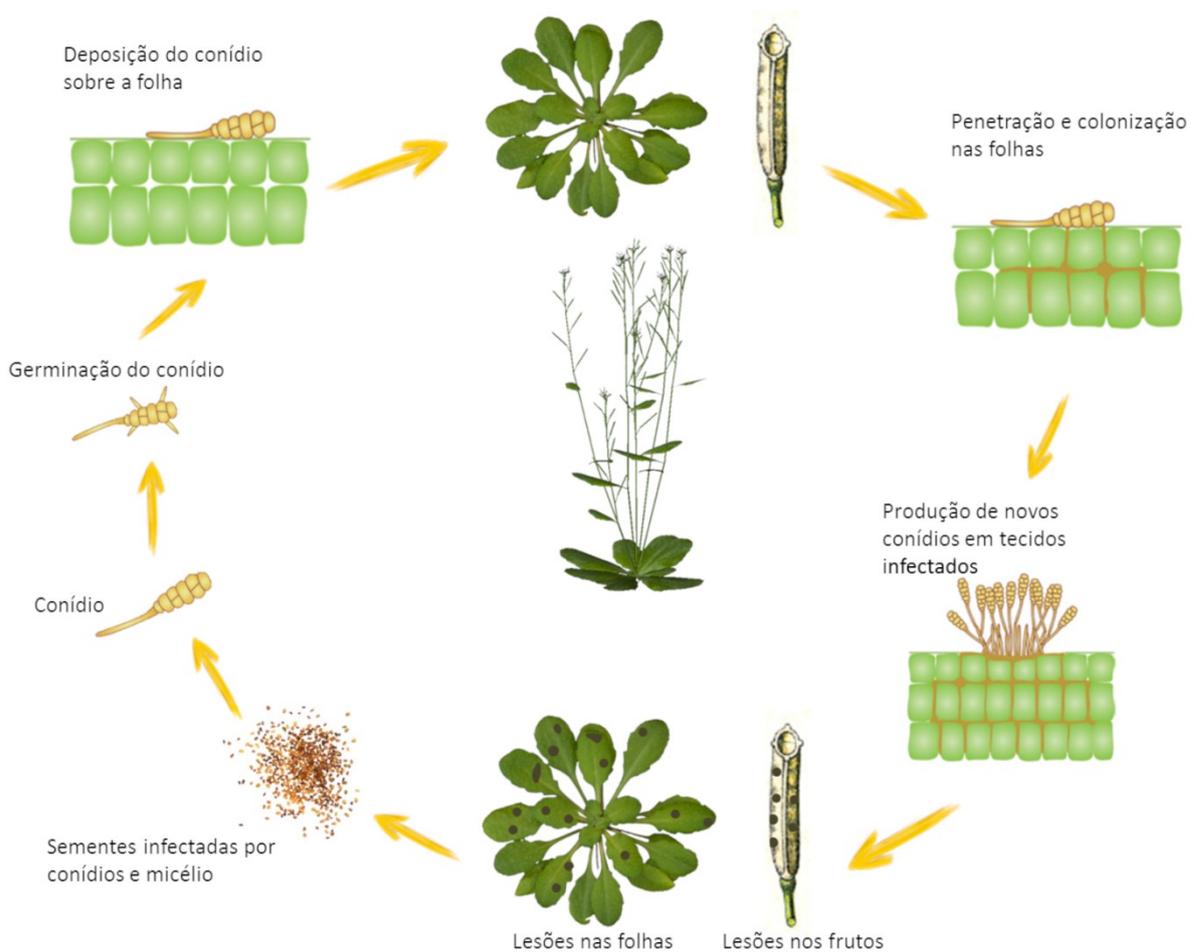
O gênero *Alternaria* possui espécies que são principalmente saprófitas, mas algumas podem ser consideradas fitopatógenas (CHO, 2015). *A. brassicicola* é um fungo necrotrófico, causador da doença da mancha negra em uma ampla variedade de espécies de Brassicaceae, incluindo *A. thaliana* (BELMAS et al., 2018).

Da mesma forma que outros patógenos necrotróficos, *A. brassicicola* utiliza diversos fatores de patogenicidade e mata o tecido hospedeiro à medida que coloniza e se desenvolve no conteúdo de células mortas (BELMAS et al., 2018). Esse mecanismo é descrito como um processo de duas etapas (Figura 3). O primeiro passo é a germinação dos conídios, onde há a produção de um ou mais tubos germinativos. Posteriormente, através dos estômatos, cutícula ou ferimentos, o fungo penetra na planta, formando ou não apressórios (ROTEM, 1998; THOMMA, 2003). Após a penetração, ocorre a indução de morte celular programada ou a morte de células hospedeiras com a utilização de toxinas (ERRAKHI et al., 2008; OLIVER; SOLOMON, 2008; PANDELOVA et al., 2009; ROTEM, 1998; THOMMA, 2003). Essas podem ser divididas, baseadas na sua seletividade, como hospedeiro-inespecíficas e hospedeiro-específicas (NOWICKI et al., 2012; THOMMA, 2003). As toxinas hospedeiro-inespecíficas, como a brefeldina A, ácido tenuazônico, tentoxina e zinniol, possuem efeitos fitotóxicos relativamente suaves. Elas afetam um amplo espectro de espécies de plantas e são consideradas um fator adicional da infecção, assim como os mecanismos de penetração e processos enzimáticos. Apesar de atuarem como fatores de virulência, intensificando a gravidade dos sintomas, não são absolutamente necessários para o estabelecimento da

alternariose, doença causada por *Alternaria* spp (THOMMA, 2003). As toxinas hospedeiro-específicas, como AB-toxina, estão envolvidas no desenvolvimento da alternariose, e geralmente exibem efeitos severos no hospedeiro, sendo indispensáveis para a doença (THOMMA, 2003).

Posterior à morte das células hospedeiras, os tecidos são decompostos por várias enzimas ativas de carboidratos, do inglês carbohydrate-active enzymes (CAZys), também conhecidas como enzimas de degradação da parede celular (EDPC), ou *cell wall-degrading enzymes* (CWDEs) (LEBEDA et al., 2001; VIDHYASEKARAN, 2008).

Figura 3 - Ciclo da doença causada por fungos do gênero *Alternaria* sp.



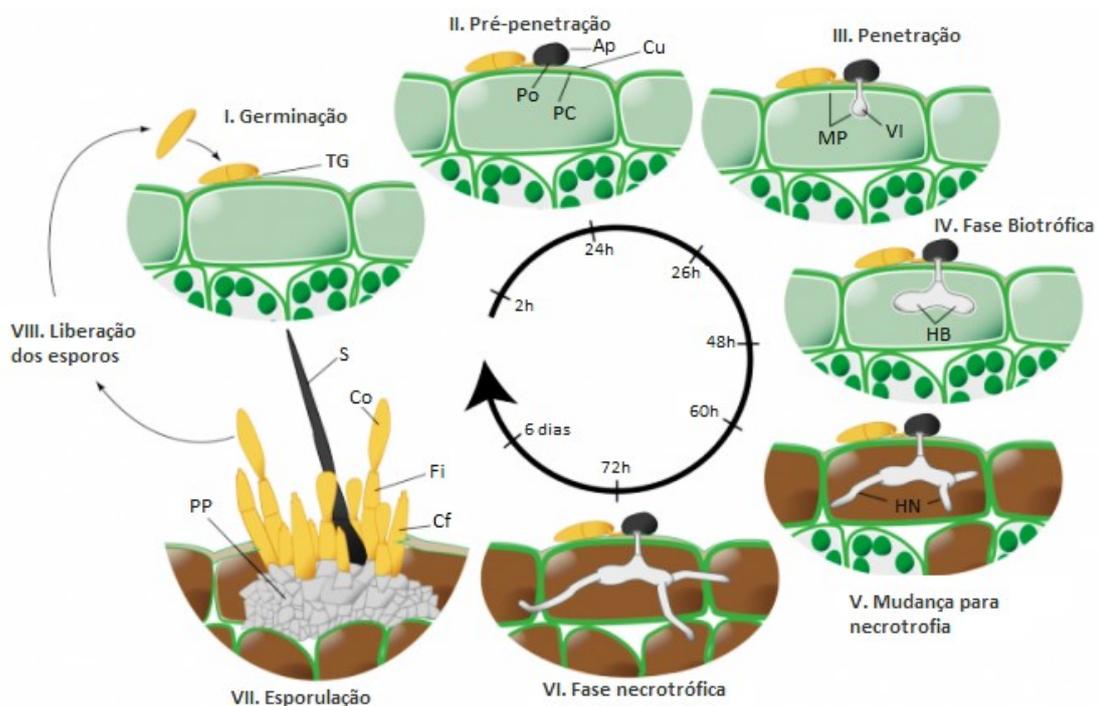
O processo infeccioso tem início com a germinação dos conídios e a produção de tubos germinativos. A penetração das hifas pode ocorrer através dos estômatos ou, após a formação de apressórios, diretamente por meio da cutícula. A colonização ocorre nas células vegetais, onde o patógeno utiliza diversas enzimas e toxinas, causando a morte do tecido hospedeiro. Sementes infectadas por conídios e micélio, em condições favoráveis à doença, favorecem ciclos secundários do patógeno durante o ciclo da cultura, levando a epidemias no campo. Fonte: Adaptado de Pereira *et al.* (2013).

2.4.2 *Colletotrichum higginsianum*

O gênero *Colletotrichum* é um dos grupos economicamente mais importantes de patógenos de plantas, causadores de antracnose em mais de 3200 espécies de mono e dicotiledôneas, incluindo gramíneas, leguminosas e frutíferas (CANNON et al., 2012). *C. higginsianum* é um fungo hemibiotrófico que infecta diversas espécies da família Brassicaceae, incluindo *A. thaliana*, fazendo com que esse seja um modelo de interação planta-patógeno muito estudado (HUSER et al., 2009; O'CONNELL et al., 2004).

Como um fungo hemibiotrófico, esse patógeno apresenta dois estágios no ciclo infeccioso (Figura 4). Durante a infecção, normalmente são produzidas hifas de germinação pelos conídios da antracnose, que se diferenciam em apressórios melanizados e entram na célula vegetal através da produção de cavidades de penetração. Inicialmente, hifas primárias biotróficas são formadas dentro da célula vegetal, onde a sua proliferação faz com que as células epidérmicas sejam invadidas. Após, as hifas secundárias necrotróficas se espalham pelas células hospedeiras, causando clorose e necrose (O'CONNELL et al., 2004, 2012; PERFECT et al., 1999). Além disso, esses fungos possuem uma série de estruturas especializadas necessárias para a infecção, incluindo tubos germinativos, apressórios, hifas primárias biotróficas e hifas secundárias necrotróficas (PERFECT et al., 1999).

Figura 4 - Ciclo da doença causada por *C. higginsianum*.



Inicialmente, os conídios aderem à superfície foliar e germinam, formando o tubo germinativo. Em seguida, formam o apressório que penetra a cutícula e a parede celular. Nas células epidérmicas são formadas vesículas de infecção e hifas biotróficas primárias. A fase necrotrófica se inicia através da formação de hifas necrotróficas secundárias, que se ramificam e se espalham pelas células vegetais, causando a morte do tecido hospedeiro. TG: tubo germinativo, Ap: apressório, Cu: cutícula, Po: poro, PC: parede celular, MP: membrana plasmática, VI: Vesícula infecciosa, HB: hifas biotróficas, HN: hifas necrotróficas, Cf:conidióforo, Fi: fiálide, Co: conídeo, PP: Pseudo-parênquima, S: seta. Fonte: Adaptado de Dallery (2018).

O patossistema *C. higginsianum* x *A. thaliana* se tornou um modelo atraente para análise molecular de interações planta-fungo devido o estilo de vida hemibiotrófico e as transições no desenvolvimento desse patógeno (HUSER et al., 2009). *C. higginsianum* pode ser cultivado axenicamente (em um meio de cultura estéril, evitando a competição e garantindo uma maior produtividade) e transformado de maneira estável (O'CONNELL et al., 2004). Além disso, a planta hospedeira também é passível de manipulação molecular, favorecendo diferentes estudos acerca do patossistema.

2.5 *Arabidopsis thaliana* COMO ORGANISMO MODELO

A. thaliana é uma pequena planta pertencente à família Brassicaceae, com ampla distribuição natural no hemisfério norte. A espécie se desenvolve rapidamente, onde os processos de germinação das sementes, formação de uma planta de roseta e da haste principal, floração e a maturação das primeiras sementes são completados em seis semanas. As flores têm 2 mm de comprimento e se autopolinizam. O fruto é do tipo síliqua e pode conter de 30 a 60 sementes, que têm 0,5 mm de comprimento. As folhas são cobertas com tricomas, e são frequentemente utilizadas no estudo da morfogênese e diferenciação celular (MEINKE, 1998).

A biologia da espécie, o tamanho pequeno do genoma completamente sequenciado, a extensa coleção de mutantes, juntamente com a presença de técnicas especializadas de transformação, tornaram a *Arabidopsis* um ótimo modelo genético e molecular para pesquisas em diversas áreas da biologia vegetal, como biologia molecular, bioquímica, genética, incluindo interação patógeno-hospedeiro (ANDARGIE; LI, 2016; GLAZEBROOK; ROGERS; AUSUBEL, 1997). Além de apresentar grande variação genética, é susceptível a diferentes patógenos e apresenta respostas de defesa que foram observadas em outros organismos hospedeiros, incluindo a ativação de defesas químicas e enzimáticas e resistências do tipo gene-a-gene e a resistência sistêmica adquirida (GLAZEBROOK; ROGERS; AUSUBEL, 1997; NISHIMURA; DANGL, 2010). Estão disponíveis para análise

experimental, diferentes ecótipos coletados de populações naturais, sendo Columbia e Landsberg os padrões aceitos para estudos genéticos e moleculares (MEINKE, 1998). Além disso, através da tecnologia de microarranjos, desenvolvida pouco antes do sequenciamento de Col-0, resultou em uma enorme quantidade de dados gerados sobre *A. thaliana* publicados e disponíveis gratuitamente (NISHIMURA; DANGL, 2010). Dessa forma, *A. thaliana* se tornou uma das espécies mais utilizadas nos estudos de interação planta-patógeno, para elucidação de mecanismos moleculares envolvidos na resistência e susceptibilidade às infecções.

2.6 BANCO DE DADOS PÚBLICOS COMO FERRAMENTA DE ANÁLISE *IN SILICO*

Atualmente, há uma grande geração de dados provenientes de pesquisa, onde muitos são depositados em bancos de dados públicos. Esses dados públicos possibilitam gerar e testar hipóteses *in silico*, como complemento aos experimentos realizados no laboratório ou até mesmo, como uma alternativa à falta de recursos enfrentados em muitos grupos de pesquisa. Contudo, a deposição de dados em repositórios requer experiência em bioinformática para manipulação, interpretação e análise (WAESE et al., 2017).

A. thaliana, por ser uma planta modelo possui diversos bancos de dados disponíveis para as diferentes informações acerca da espécie como Araport (KRISHNAKUMAR et al., 2015) e TAIR (BERARDINI et al., 2015), onde é possível obter informações sobre anotações e sequências, o BAR *Arabidopsis Interactions Viewer* (GEISLER-LEE et al., 2007), que apresenta as interações proteína-proteína e SUBA3 (TANZ et al., 2012) para informações de localização subcelular.

Entretanto, apesar desses bancos possuírem ferramentas que relacionam esses conjuntos de dados públicos e transformam em representações visuais, facilitando análises, cada um possui interface própria e informações específicas e categorizadas de maneira distinta, o que pode dificultar as pesquisas devido ao tempo e complexidade de busca.

Dessa forma, visando combinar diferentes dados encontrados em sites distintos em uma única interface, Waese e colaboradores (2017) elaboraram uma ferramenta de software que integra dados em um único site, o *ePlant* (<http://bar.utoronto.ca/eplant/>), apresentando análises de expressão gênica, localizações subcelulares documentadas experimentalmente para 10.910 proteínas de *Arabidopsis*, interações proteína-proteína e proteína-DNA, estruturas em 3D, além de anotações gênicas, publicações e dados sobre variação na expressão gênica

em ecótipos coletados em diferentes partes do mundo (WAESE et al., 2017). A partir do *ePlant*, é possível analisar a expressão de conjunto de genes de *A. thaliana* em diversas condições experimentais. Essa ferramenta foi construída a partir de dados de microarranjos realizados por diferentes grupos de pesquisa, e depositados em bancos de dados públicos. O site disponibiliza os dados em forma de figuras com o padrão de expressão sendo demonstrado em diferentes cores, porém os dados brutos estão disponíveis para *download*, possibilitando explorá-los em análises mais complexas, de acordo com a pesquisa a ser realizada.

Entre as ferramentas disponíveis no *ePlant*, encontra-se a “*Tissue and Experiment eFP Viewer*” (Visualizador eFP para tecidos e experimentos), que fornece informações detalhadas sobre a expressão gênica em tecidos individuais e resultados de experimentos de resposta a estresses. Das 22 visualizações neste módulo, oito são repostas a estresses bióticos, nas quais quatro representam interações planta x fungos. Dessa forma, é possível comparar esses dados com os obtidos em outros experimentos, e explorar as informações depositadas para um respectivo grupo ou família de genes de interesse.

3 JUSTIFICATIVA

Pesquisas realizadas até o presente momento demonstram que alguns membros da família das DRBs estão presentes nos mecanismos de defesa baseados na via de silenciamento de RNA, contra vírus e bactérias. Os estudos demonstram que DRB3 participa na defesa antiviral por metilação, fazendo com que a replicação e transcrição do vírus sejam reprimidas (RAJA et al., 2014). DRB4 também é necessária para resistência mediada por genes *R* contra patógenos bacterianos, sugerindo um papel mais universal dessa proteína na resistência contra organismos patogênicos (ZHU et al., 2013).

Embora as DRBs tenham sido abordadas nos patossistemas acima referidos, nenhuma observação foi feita durante interação planta-fungo. Nos últimos anos, os estudos focando a relação entre plantas e fungos patogênicos têm sido bastante expressivos, principalmente devido à importância econômica que esses patógenos causam na agricultura. A infecção de sementes causa redução na germinação e no vigor das plântulas, afetando o uso e a comercialização de sementes infectadas. Lesões em folhas, caules e síliquas reduzem a área fotossintética e aceleram a senescência na planta (NOWICKI et al., 2012).

Até o presente momento, nenhum estudo investigou se as DRBs participam das vias moleculares ativadas ou reprimidas por infecção fúngica. Dessa forma, a investigação sobre a modulação da expressão gênica dessas proteínas durante a interação planta-fungo patogênico ampliará o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos nesse patossistema. Essas informações, somadas às análises de expressão também de miRNAs, poderão auxiliar na identificação de um novo papel da maquinaria de RNAi durante o estresse biótico.

Os patossistemas *Arabidopsis-Alternaria* e *Arabidopsis-Colletotrichum* foram utilizados nesse trabalho, pois ambas as interações são bem conhecidas, todos os organismos são de fácil análises genéticas, bem como as técnicas a serem empregadas estão previamente estabelecidas.

4 HIPÓTESE

Devido o prévio conhecimento de que as proteínas DRBs estão envolvidas nos mecanismos de defesa vegetal contra vírus e bactérias, bem como, alguns miRNAs são responsivos ao ataque de fungos, a hipótese científica do presente trabalho é de que ocorrerá modificação na expressão gênica das proteínas DRBs em plantas infectadas com *A. brassicicola* e *C. higginsianum*, que conseqüentemente influenciarão na expressão de alguns de miRNAs.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a expressão dos genes codificantes para as proteínas DRBs e miRNAs em *Arabidopsis thaliana* durante a interação planta-patógeno.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

5.2.1 Analisar a expressão dos genes DRBs em *A. thaliana* durante infecção com o fungo necrotrófico *A. brassicicola* e com o fungo hemibiotrófico *C. higginsianum*;

5.2.2 Selecionar e analisar a expressão de miRNAs candidatos em *A. thaliana* durante a infecção com *A. brassicicola*;

5.2.3 Analisar a expressão gênica das proteínas DRBs em *A. thaliana* durante infecção fúngica baseadas em banco de dados públicos.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 MATERIAL VEGETAL

Os processos de produção do material vegetal, bem como o cultivo e inoculação dos fungos, foram realizados no Laboratório de Fitopatologia localizado no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de Santa Catarina.

Sementes de *A. thaliana*, ecótipo Columbia, acesso 0 (Col-0), foram estratificadas a 4°C, no escuro, por três dias. Após, foram semeadas em potes contendo uma mistura de solo turfado e vermiculita (1:1, v/v) e incubadas em sala de crescimento, sob temperatura de 23°C, 16 h de luz e densidade de fluxo de fótons de 160 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

6.2 INOCULAÇÃO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

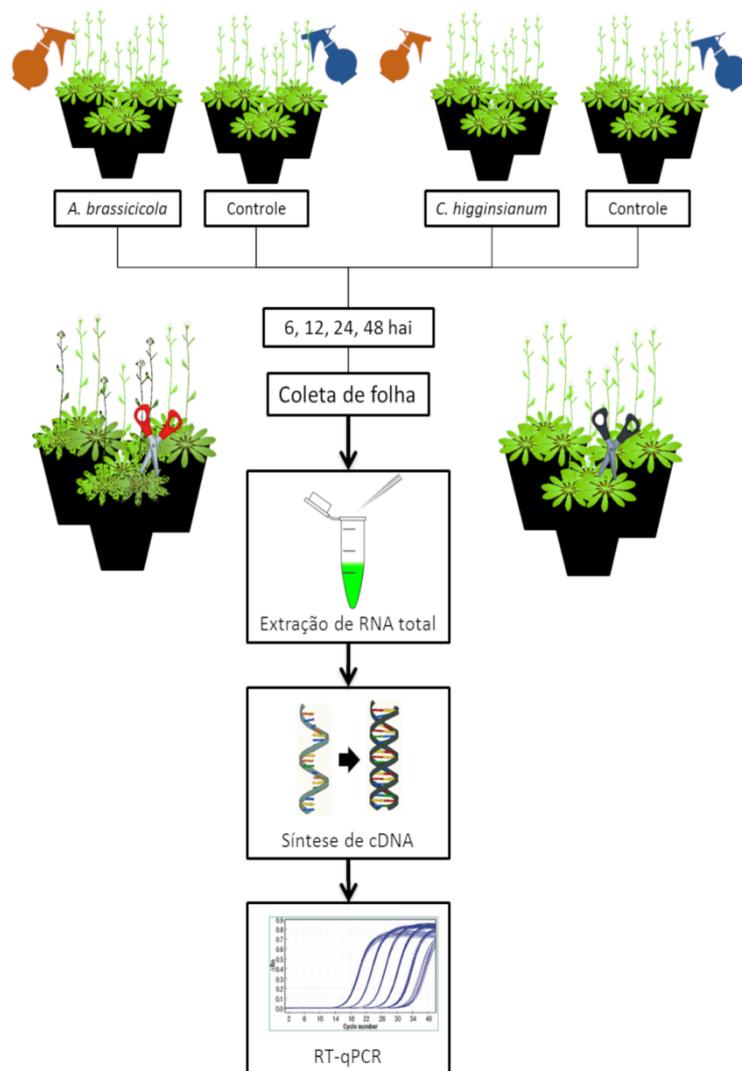
Foram utilizadas nos experimentos as cepas 125088 CBS e IMI 349063 de *A. brassicicola* e *C. higginsianum*, respectivamente.

Inicialmente, os fungos foram repicados em placas de Petri contendo meio de cultura suco V8-ágar (*A. brassicicola*) e aveia-ágar (*C. higginsianum*) e cultivados para esporulação sob condições de 25°C e fotoperíodo de 12 h, durante 15 dias (DE FREITAS et al., 2015). Após o crescimento, adicionou-se às placas de Petri 10 mL de água destilada para raspagem dos conídios. A suspensão conidial foi recolhida e filtrada em camada dupla de gaze esterilizada para a remoção de fragmentos do micélio. O número de conídios foi estimado usando uma câmara de contagem Neubauer. A concentração dos inóculos foi ajustada a 1×10^5 conídios/mL com água destilada.

Plantas de *A. thaliana* com cinco semanas foram inoculadas utilizando um borrifador com uma suspensão homogênea de conídios de *A. brassicicola* e plantas com seis semanas foram inoculadas com *C. higginsianum* (aproximadamente 4 mL de conídios por planta). O mesmo procedimento foi realizado em um grupo controle borrifando com água destilada. As plantas foram mantidas sob uma condição altamente úmida (umidade > 90%) durante 48 h. Para a extração de RNA, foram coletadas folhas da roseta de ambos os grupos, inoculado e controle. A coleta foi realizada nos tempos: 6, 12, 24 e 48 horas após a inoculação (hai), sendo recolhidas três replicatas biológicas, compostas por um *pull* de três plantas por

replicata, em cada tempo. Após a coleta, as amostras foram mantidas em ultrafreezer (-80°) para posterior extração de RNA e análises moleculares (Figura 5).

Figura 5 - Delineamento experimental de *A. thaliana* infectada com *A. brassicicola* e *C. higginsianum*.



12 plantas de *A. thaliana* foram inoculadas com solução conidial de *A. brassicicola* e *C. higginsianum*, enquanto água destilada foi borrifada em 12 plantas do grupo controle. Folhas da roseta foram coletadas 6, 12, 24 e 48 horas após a inoculação, em cada grupo. O material vegetal foi armazenado a -80°C para posterior extração de RNA total, seguido de síntese de cDNA e RT-qPCR. Fonte: Elaboração da autora (2020).

6.3 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

O RNA total foi isolado a partir de folhas da roseta de três replicatas biológicas infectadas ou não, após os tempos acima descritos, utilizando o reagente Trizol (Invitrogen,

Carlsbad, CA, USA). A quantidade e integridade do RNA total foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1% e por espectrofotometria no equipamento NanoDrop (ThermoFisher).

6.4 SÍNTESE DE cDNA E PCR QUANTITATIVA

6.4.1 Síntese de cDNA poli-T

Para a análise da expressão dos genes *DRBs* foi utilizada as reações de RT-qPCR. Para isso, o primeiro passo foi a síntese do cDNA poli-T a partir de aproximadamente 1 µg de RNA total. Cada reação foi iniciada com um pool de 1 µg/µl de oligonucleotídeo dT24V (Invitrogen) e 10 mM de dNTP 5 mM (Ludwig). Antes da transcrição, o RNA e os iniciadores foram misturados para um volume total de 12 µL e incubados a 65°C por 5 min, seguido de resfriamento com gelo. Em seguida, foram adicionados 4 µL de tampão *first strand* 5x (Invitrogen), 2 µL de DTT 0,1M e 200 U de enzima MML-V RT (Invitrogen) para um volume final de 20 µL. A síntese foi realizada a 37°C por 50 min em um termociclador Veriti (Applied Biosystem) e a inativação da enzima foi concluída a 70°C por 15 min. Todas as amostras de cDNA foram diluídas 100 vezes com água livre de RNase antes de serem usadas como modelo na análise de qPCR.

6.4.2 Síntese de cDNA poli-T + stem-loop

Para a análise dos miRNAs, a síntese do cDNA foi realizada pela técnica multiplex, com 1 µg do RNA total (LAO et al., 2006; TANG et al., 2006). Para cada reação foi utilizado um pool de iniciadores na concentração de 0,5 µM para os oligonucleotídeos *stem-loop* específicos para miRNAs, 1 µM de oligonucleotídeo dT25V e 0,5 mM de dNTPs. A sequência *stem-loop* consiste em 44 nucleotídeos conservados e 6 variáveis, específicos da extremidade 3' da sequência do miRNA (5' GTCGTATCCAGTGCAGGGT CCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC NNNNNN 3') (CHEN et al., 2005). Antes da transcrição reversa, RNA e iniciadores foram misturados até um volume total de 13 µL, incubados a 70°C por 5 min e então refrigerados imediatamente em gelo. Em seguida, foram adicionados 4 µL de tampão *first strand* 5x, 2 µL de DTT 0,1M e 200 U de enzima MML-V RT para um volume final de 20 µL. A síntese foi realizada segundo protocolo de Chen e

colaboradores (2005), a 42°C por 30 min, no termociclador Veriti (Applied Biosystem) e a inativação da enzima foi concluída a 85°C por 5 min. Todas as amostras de cDNA foram diluídas 100 vezes com água livre de RNase antes de serem usadas como molde na análise de RT-qPCR.

6.4.3 PCR quantitativa em Tempo Real

As análises de qPCR foram realizadas em um equipamento de PCR em tempo real StepOne Plus (Applied Biosystem), usando o fluoróforo SYBR Green I (Invitrogen) para detectar a síntese do cDNA dupla fita. As reações foram realizadas em um volume de 20 µL, contendo 10 µL do cDNA diluído (1:100), 1x SYBR Green I, 0,025 mM de dNTP, 1x PCR Buffer, 3mM de MgCl₂, 0,25 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen) 200 nM de cada oligonucleotídeo (senso e antissenso). Para amplificar regiões das sequências codificadoras (CDS) dos cinco genes de DRBs, iniciadores foram projetados utilizando o *software* Primer3plus v2.3.5, baseado nas sequências depositadas no banco de dados Phytozome v.10 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) e no banco de dados miRBASE (<http://www.mirbase.org/>), este último para as sequências de miRNAs (Apêndice A). Os pares de iniciadores utilizados para as reações, bem como os tamanhos dos fragmentos amplificados estão descritos na Tabela 1. Em todas as reações de qPCR para miRNAs, foi usado o oligonucleotídeo antissenso universal (5' GTGCAGGGTCCGAGGT 3') (CHEN et al., 2005; KULCHESKI; MARCELINO-GUIMARAES; LIMA, 2010). Todas as amostras foram analisadas em triplicatas técnicas, com um controle negativo incluído. A reação ocorreu conforme as etapas descritas a seguir: uma etapa inicial de ativação da enzima polimerase por 5 min a 94°C, 15 s a 94°C para desnaturação, 10 s a 60° C para hibridização dos oligonucleotídeos e 15 s a 72° C para extensão, durante 40 ciclos. Ao final do protocolo, foi incluída uma análise de curva de dissociação (ou curva de *melt*) e a fluorescência foi medida de 50 a 99°C. O limiar e as linhas de base foram determinados manualmente usando o StepOne Software v2.3 do equipamento de PCR em Tempo Real StepOne Plus (Applied Biosystem).

As análises da expressão dos genes das cinco DRBs foram realizadas pelo método do $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando os genes da *Actina* e da *Ubiquitina* como normalizadores.

Tabela 1 – Sequências dos iniciadores utilizados nas reações de qPCR.

Acrônimo	Transcrito	Locus	Iniciador senso (5'-3')	Iniciador antissenso (5'-3')	Amplicon
<i>DRB1</i>	AT1G09700.1	Chr1:3137767-3140353 [-]	CTCTCCGGGAATTAGCAAAA	TCGACCTTCTGGCACTGATA	145 pb
<i>DRB2</i>	AT2G28380.1	Chr2:12133811-12136180 [-]	GAAGCAAGCAGAGAAGAATGC	CGTCAATGTTCTCAGGCTCA	101 pb
<i>DRB3</i>	AT3G26932.1	Chr3:9930270-9932074 [-]	TGAGAAGAATGCAGCCATTG	TCTTGAGAGGACTCTTGCAACT	112 pb
<i>DRB4</i>	AT3G62800.1	Chr3:23225592-23227512 [-]	ACCTTCTTCCAAGGTGGTGA	TCTCAGGCTCATTCAAAGCA	137 pb
<i>DRB5</i>	AT5G41070.1	Chr5:16438307-16440046 [+]	CATTGCAGCTTGGTCCTCTT	CCATTGGTTTGTGTCTCTCG	139 pb
<i>ACT2</i>	AT3G18780.2	Chr3:6474710-6477204[+]	CGGTGGTTCTATCTTGGCATC	GTCTTTCGCTTCAATAACCCTA	142 pb
<i>UBC21</i>	AT5G25760.1	Chr5:8967655-8969349 [+]	CTTGGACGCTTCAGTCTGTG	TGAACCCTCTCACATCACCA	120bp
<i>MIR159</i>	ath-miR159	Chr1: 27713233-27713416 [-]	TTTGGATTGAAGGGAGCTCTA	GTGCAGGGTCCGAGGT	71pb
<i>MIR164</i>	ath-miR164	Chr2: 19520752-19520864 [+]	TGGAGAAGCAGGGCACGTGCA	GTGCAGGGTCCGAGGT	71pb
<i>MIR169</i>	ath-miR169	Chr5: 8527469-8527649 [+]	CAGCCAAGGATGACTTGCCGG	GTGCAGGGTCCGAGGT	71pb
<i>MIR172</i>	ath-miR172	Chr2: 11942914-11943015 [-]	AGAATCTTGATGATGCTGCAT	GTGCAGGGTCCGAGGT	71pb
<i>MIR396</i>	ath-miR396	Chr2: 4142323-4142473 [-]	TTCCACAGCTTTCTTGAAC TG	GTGCAGGGTCCGAGGT	71pb

6.4.4 Seleção de genes de referência para análise de miRNAs

Em análises de expressão gênica, para corrigir a variabilidade que pode surgir e se acumular em várias etapas da RT-qPCR, como qualidade das amostras de RNA, eficiência enzimática, diferenças entre tecidos e células, é realizada a normalização dos níveis de expressão calculados para os genes de interesse (REMANS et al., 2008). A quantificação relativa é o método mais utilizado, no qual o nível de expressão gênica é normalizado ao de um gene de referência interno (BRUNNER; YAKOVLEV; STRAUSS, 2004). Genes de manutenção (*housekeeping*), como *ACT2* (Actina2), são geralmente utilizados como genes de referência, pois estão envolvidos em processos celulares básicos, e muitas vezes apresentam um nível de expressão uniforme em diferentes órgãos e tratamentos (REMANS et al., 2008), entretanto esse comportamento não é uma regra, e em algumas situações estes genes podem apresentar uma expressão variável (CZECHOWSKI et al., 2005).

Kulcheski e colaboradores (2010) compararam a estabilidade de genes de miRNAs com relação a genes codificadores de proteínas. Os resultados mostraram que todos os genes de miRNAs foram mais estáveis que os genes de mRNA, indicando que miRNAs podem ser usados como normalizadores em análises de expressão gênica tanto de miRNAs como para genes codificadores de proteínas.

Sendo assim, para selecionar os genes de referência para análise de miRNAs, foi comparada a estabilidade da expressão de cinco genes de miRNAs (*MIR159*, *MIR164*, *MIR169*, *MIR172* e *MIR396*) e da *Actina*.

A estabilidade de expressão de cada gene de referência candidato foi analisada usando o software geNorm (VANDESOMPELE et al., 2002). O programa geNorm utiliza um algoritmo para calcular um valor M, que é uma medida de estabilidade da expressão gênica definida como a variação pareada média de um determinado gene em comparação com os demais genes testados. Os genes com o valor M mais baixo indicam a expressão mais estável, enquanto os valores M mais altos indicam a expressão menos estável. Para essas análises, os valores do *threshold cycle* (Ct) foram convertidos em quantidades pelo método comparativo de Ct. O software geNorm também foi usado para determinar o número ideal de genes necessários para a normalização.

6.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O modelo de Equações de Estimações Generalizadas (*Generalized Estimating Equations* – GEE) ($p \leq 0,05$) foi utilizado para comparar a diferença entre as amostras infectadas e controle. Esse modelo foi proposto por Liang e Zeger (1986) para estimar parâmetros de regressão em dados relacionados.

Para realizar a análise de GEE, é necessário formatar o banco de dados em um formato chamado de dados empilhados. Nesse trabalho, os dados foram formatados em três colunas fixas, sendo uma para a identificação dos indivíduos, uma especificando a qual grupo este pertence (controle = 0 e infectado = 1) e uma de identificação do tempo (6, 12, 24 e 48 horas), além de uma coluna para cada gene analisado (*DRB1*, *DRB2*, *DRB3*, *DRB4*, *DRB5*, *MIR164*, *MIR169* e *MIR172*).

A análise foi realizada no software SPSS v. 25.0, onde foram avaliadas as diferenças entre grupos, entre os tempos e entre grupo x tempo. O valor p foi obtido pelo teste qui-quadrado de Wald. Diferenças significativas entre as variáveis foram analisadas através do teste de Bonferroni.

6.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS ÀS DOENÇAS FÚNGICAS UTILIZANDO BANCO DE DADOS PÚBLICOS

A interface do site ePlant é composta por dois elementos principais: à esquerda, o painel genético e os ícones de navegação dos módulos e o painel de visualização de dados à direita. A pesquisa no site inicia com a inserção do nome de gene na caixa de seleção de genes no canto superior esquerdo. Os dados, provenientes de serviços da web, são carregados e o resultado é gerado no painel visualizador dos módulos para cada gene pesquisado.

A ferramenta *Tissue and Experiment eFP Viewer*, do ePlant (<http://bar.utoronto.ca/eplant/>) foi utilizada para análise de genes DRBs a estresses bióticos causados por fungos patogênicos. Os dados foram depositados por outros grupos de pesquisa no banco de dados gratuito e são resultados de experimentos realizados utilizando a técnica de microarranjos.

A ferramenta foi explorada para analisar a expressão gênica em experimentos de resposta a estresses bióticos causados pelos fitopatógenos *Botrytis cinerea*, *Erysiphe orontii* e *Phytophthora infestans*..

Foram observados os níveis máximos de expressão gênica para cada experimento, os quais são demonstrados por diferentes cores, sendo azul utilizado para menor expressão, amarelo quando não há expressão gênica e vermelho para maior expressão gênica.

Dessa forma, foi possível observar a variação da expressão dos genes *DRBs* durante os experimentos e comparar os padrões de expressão entre os diferentes tempos e patossistemas. Apesar dos resultados serem provenientes de experimentos distintos, a expressão gênica é apresentada em uma escala comum, facilitando a análise e comparação.

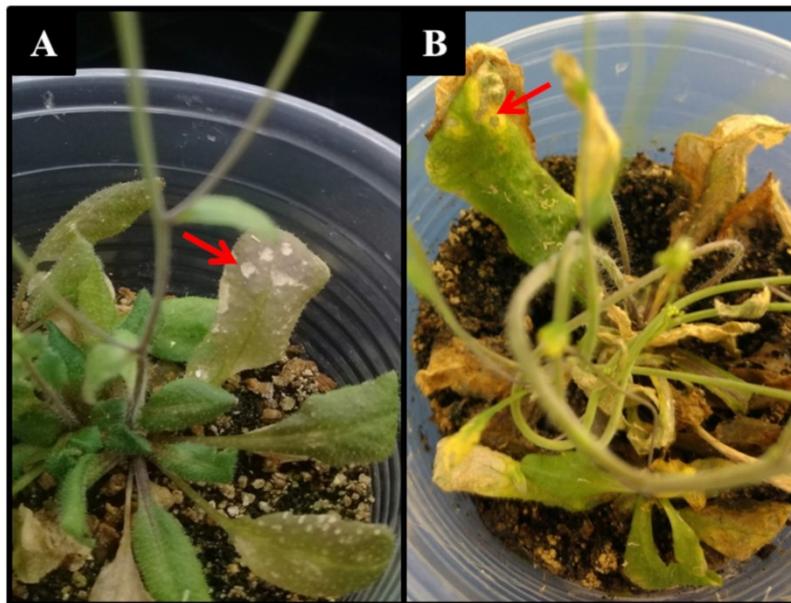
7 RESULTADOS

7.1 INFEÇÃO FUNGICA

A manifestação dos sintomas de mancha negra e antracnose em *Arabidopsis* torna direta a verificação da viabilidade dos conídios utilizados para a infecção. Contudo, nos tempos iniciais considerados na cinética desse experimento (6, 12, 24 e 48 hai) ainda não é possível observar a presença dos sintomas. Portanto, para confirmar que as plantas foram de fato infectadas por *A. brassicicola* e *C. higginsianum*, as replicatas biológicas utilizadas para coleta de 48 hai foram mantidas em sala de crescimento durante 10 dias.

Como resultado, foi possível observar a manchas características das doenças em folhas pulverizadas com suspensão conidial, confirmando a infecção (Figura 6).

Figura 6 - Sintomas das doenças da mancha negra e antracnose em *A. thaliana*.



Plantas inoculadas foram mantidas durante 10 dias após a infecção com suspensão conidial de (A) *A. brassicicola* e (B) *C. higginsianum*. As setas apontam os sintomas das doenças da mancha negra e antracnose, respectivamente. Fonte: Elaboração da autora (2020).

7.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS PROTEÍNAS DRBs EM *A. thaliana* INFECTADA COM *A. brassicicola*

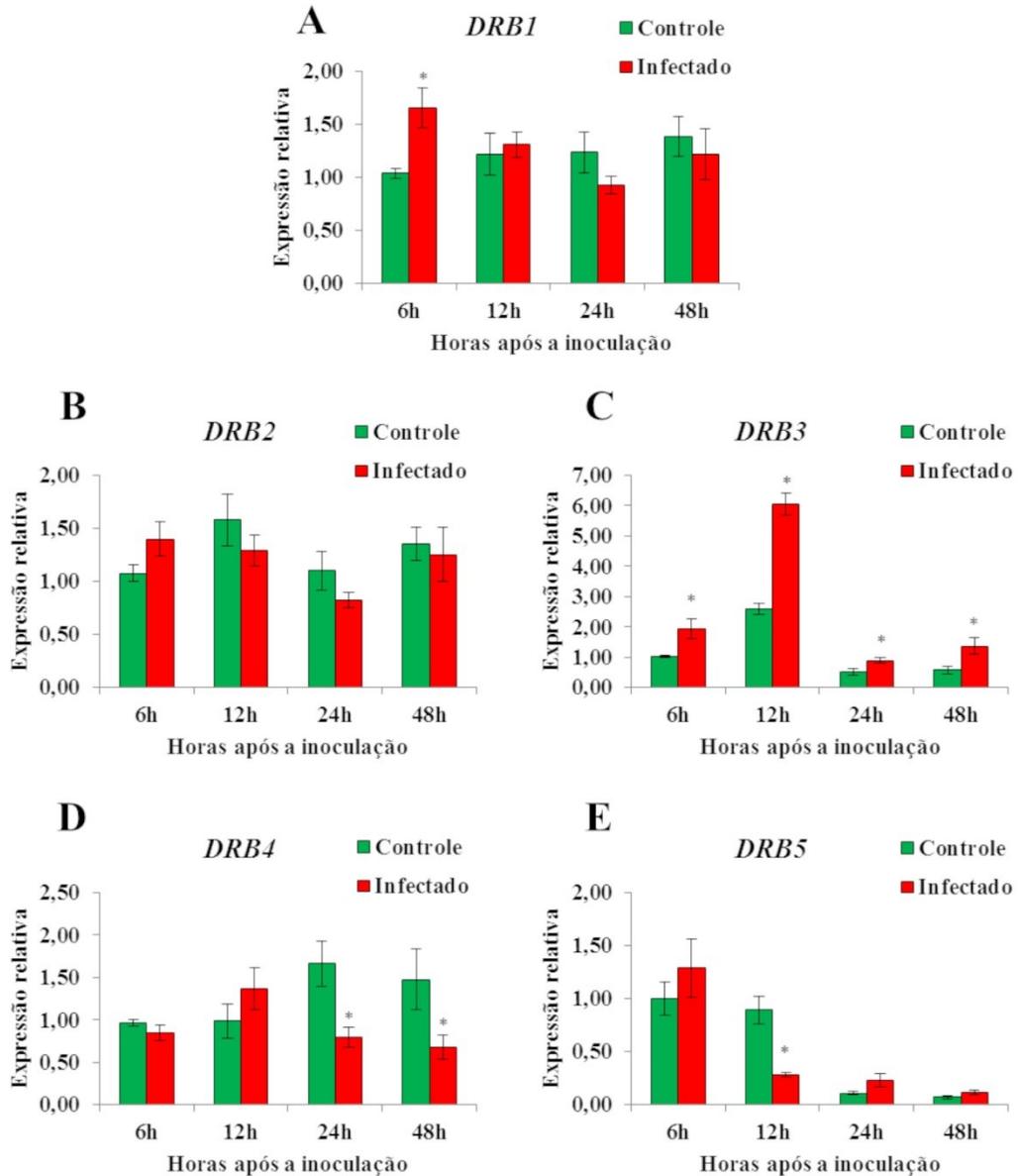
Para verificar se a infecção causada por *A. brassicicola* modula os genes das cinco DRBs, plantas de *A. thaliana* foram inoculadas com o fungo patogênico e as análises de RT-qPCR foram realizadas. Desta forma, foram comparados os níveis de expressão gênica entre o grupo infectado e o grupo controle ao longo da cinética de quatro tempos distintos após a infecção fúngica, bem como, foram também comparados a expressão diferencial dentro dos grupos controle e infectado ao longo dos tempos analisados.

Os dados obtidos por PCR quantitativa em *A. thaliana* infectada com *A. brassicicola* mostraram uma expressão diferencial dos genes *DRB1*, *DRB3*, *DRB4* e *DRB5* (Figura 7 e Apêndice B).

A expressão de *DRB1* foi induzida no início da infecção (1,60 vezes), no ponto de 6 hai. *DRB2* não apresentou diferenças estatísticas significativas entre os grupos infectados e controles. Em todos os tempos, houve uma maior expressão de *DRB3* no grupo infectado comparado ao controle, com uma aumento de cerca de 1,7 a 2,5 vezes maior no primeiro. *DRB4* apresentou repressão no grupo infectado, quando comparado ao grupo controle, sendo menos expresso cerca de 2 vezes nos pontos 24 e 48 hai. Por fim, *DRB5* foi fortemente reprimido 12 hai (3 vezes).

Além disso, observou-se que os genes apresentam expressão diferencial ao longo dos tempos estudados (Apêndice B). Foram encontradas diferenças significativas na expressão de *DRB1* no grupo infectado entre os tempos 6 e 24 h. Entretanto, o grupo controle não apresentou diferenças durante a infecção, assim como o grupo controle de *DRB2*. Contudo, o grupo infectado apresentou uma menor expressão de *DRB2* em 24 hai, comparado aos tempos 6 e 12. Quando analisadas as diferenças na expressão de *DRB3* no grupo controle, observa-se um aumento na expressão de 6 para 12 hai, seguido de uma diminuição em 24 hai e 48 horas. Já para o grupo infectado, foram observadas diferenças significativas entre os tempos 6, 12 e 24 hai. Interessantemente, apesar de apresentar diferenças significativas entre os grupos controle e infectado, quando analisada a modulação do gene *DRB4* dentro dos grupos ao longo do tempo, não foram encontradas diferenças na expressão gênica. A expressão do gene *DRB5* no grupo infectado foi bastante variável ao longo da infecção, sendo induzido em 6 hai, fortemente reprimido em 12 hai e mantendo baixos níveis de expressão em 24 e 48 hai. Já o grupo controle apresentou níveis maiores de expressão nos tempos 6 e 12, diminuindo a expressão gênica em 24 e 48 hai.

Figura 7 - Expressão relativa dos genes *DRBs* em *A. thaliana* nos grupos controle e infectado com *A. brassicicola*.



(A) *DRB1*, (B) *DRB2*, (C) *DRB3*, (D) *DRB4* e (E) *DRB5*. Grupo controle está representado pela cor verde e grupo infectado com *A. brassicicola* em vermelho. Análise de PCR quantitativa em tempo real pelo método de expressão relativa $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os valores foram normalizados com os genes de referência *Actina* e *Ubiquitina*. Foram utilizadas triplicatas biológicas e técnicas para a PCR quantitativa em tempo real. Diferenças estatísticas entre grupo infectado e controle ($p < 0,05$) estão destacadas com asterisco (*). Fonte: Elaboração da autora (2020).

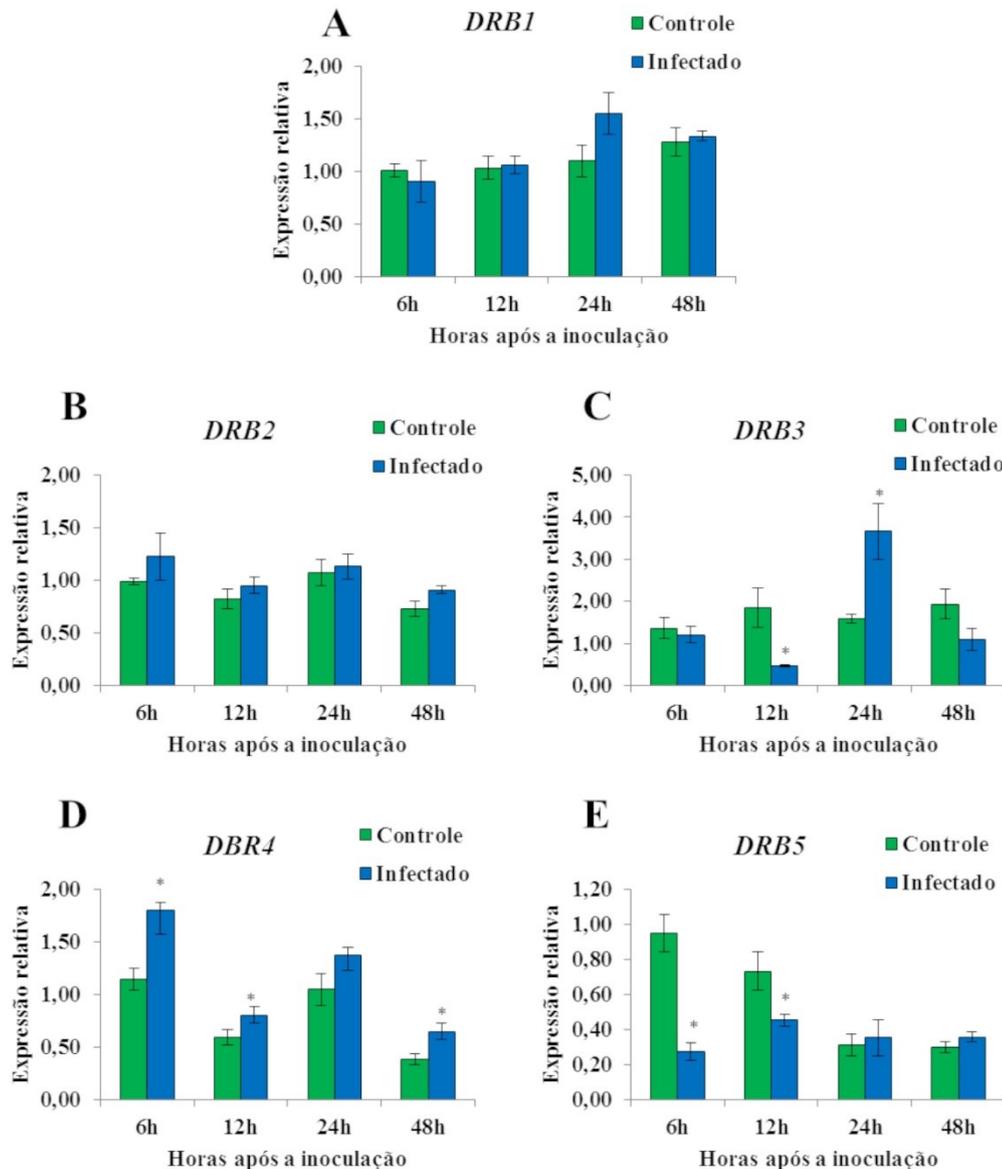
7.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS PROTEÍNAS DRBs EM *A. thaliana* INFECTADA COM *C. higginsianum*

Observou-se uma expressão diferencial dos genes *DRB3*, *DRB4* e *DRB5* entre os grupos controle e infectado por *C. higginsianum* em alguns pontos de avaliação. O perfil de expressão para os cinco genes analisados é apresentado na Figura 8 e no Apêndice C.

DRB3 foi fortemente reprimido em 12 hai (4 vezes), porém foi induzido em 24 h (2,3 vezes). Interessantemente, ao contrário de plantas infectadas com *A. brassicicola*, a infecção com *C. higginsianum* induziu a expressão do gene *DRB4* nos pontos 6 (1,6 vezes), 12 (1,4 vezes) e 48 (1,7 vezes) hai. Também foi identificada uma expressão diferencial do gene *DRB5* no início da infecção, sendo a expressão três vezes menor no grupo infectado em 6hai e 1,6 vezes em 12 hai, em relação ao grupo controle. Contudo, *DRB1* e *DRB2* não foram diferencialmente expressos durante a infecção por *C. higginsianum* (Figura 8).

Observaram-se também as variações ao longo dos tempos quando analisadas as diferenças dentro dos grupos controle e infectado (Apêndice C). Dentro do grupo infectado, *DRB1* apresentou uma diferença na expressão entre os tempos 12 e 48 hai. Contudo, não houve diferença no grupo controle. As plantas não infectadas manifestaram diferenças na expressão de *DRB2* entre os tempos de 6 e 48 hai. Porém, não foram encontradas diferenças na expressão desse gene no grupo infectado. Apesar de não apresentar diferenças significativas na expressão gênica de *DRB3* durante a infecção no grupo controle, nas plantas infectadas com *C. higginsianum* apresentaram variações ao longo da infecção. A maior expressão desse gene ocorreu em 24 hai e a menor em 12 hai, sendo diferencialmente expressos em relação aos tempos 6 e 48 horas. *DRB4* apresentou o mesmo padrão entre os grupos, sendo uma maior expressão em 6 e 24 hai e reduzindo os níveis em 12 e 48 hai . A expressão gênica de *DRB5* no grupo controle variou entre os tempos iniciais (6 e 12 hai), diminuindo a expressão em 24 e 48 hai. Contudo, no grupo infectado a menor expressão ocorreu em 6 horas e a maior em 12 horas.

Figura 8 - Perfil da expressão relativa dos genes *DRBs* em *A. thaliana* nos grupos controle e infectado com *C. higginsianum*.



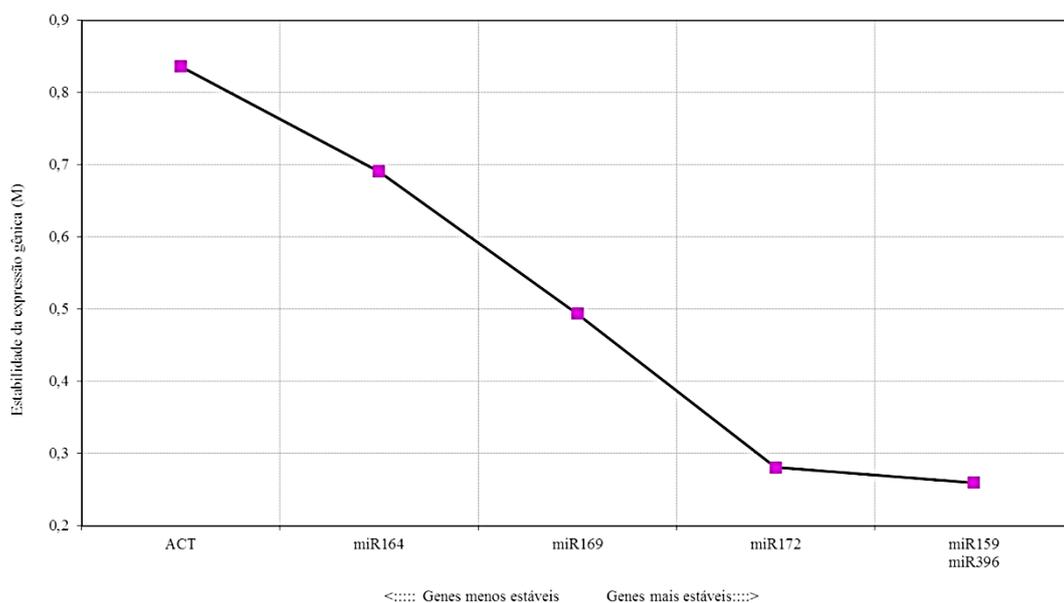
(A) *DRB1*, (B) *DRB2*, (C) *DRB3*, (D) *DRB4* e (E) *DRB5*. Grupo controle está representado pela cor verde e grupo infectado com *C. higginsianum* em azul. Análise de PCR quantitativa em tempo real pelo método de expressão relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os valores foram normalizados com os genes de referência *Actina* e *Ubiquitina*. Foram utilizadas triplicatas biológicas e experimentais para a PCR quantitativa em tempo real. Diferenças estatísticas entre o grupo infectado e controle ($p < 0,05$) estão destacadas com asterisco (*). Fonte: Elaboração da autora (2020).

7.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE miRNAs DURANTE INFECÇÃO POR *A. brassicicola*

Os miRNAs participam da regulação de genes através do silenciamento de RNA no nível pós-transcricional, possuindo um papel importante na resposta de defesa vegetal

(GUPTA et al., 2014). As respostas de defesa das plantas contra patógenos são mediadas pela ativação e repressão de uma grande variedade de genes. Ao analisar a estabilidade gênica dos cinco genes de miRNAs (*MIR159*, *MIR164*, *MIR169*, *MIR172* e *MIR396*) no software *Genorm*, bem como do possível gene de referência, a *Actina*, observou-se que todos os genes de miRNAs eram mais estáveis que o gene de *Actina*, sendo os valores médios de estabilidade da expressão (M) de *MIR159* e *MIR396* inferiores aos dos outros miRNAs, indicando que eles seriam os melhores genes para utilizar como genes de referência (Figura 9).

Figura 9 - Valores médios de estabilidade da expressão (M) dos genes de referência para as análises de miRNAs após as análises pelo software *geNorm*.

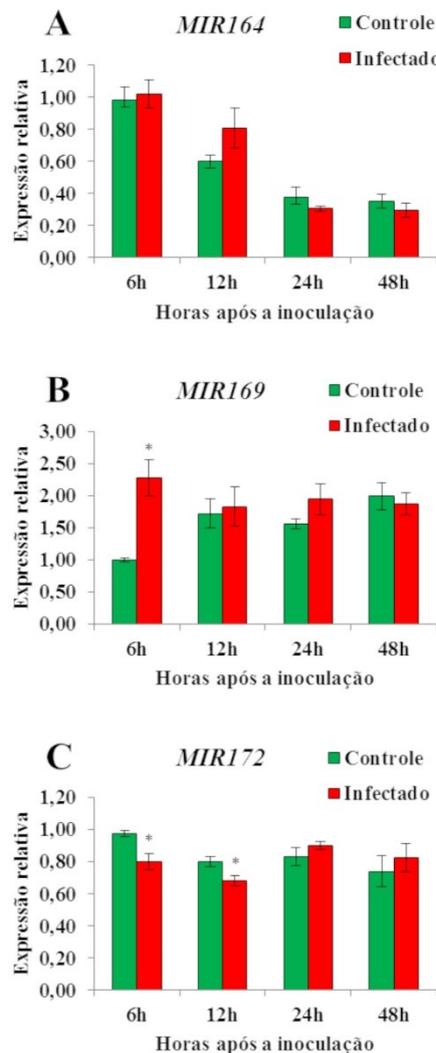


Medidas de estabilidade da expressão de todos os genes de miRNA candidatos (*MIR159*, *MIR164*, *MIR169*, *MIR172* e *MIR396*) e de *Actina*. Genes expressos de maneira mais estável são posicionados no lado direito do diagrama, menos expressos de maneira estável no lado esquerdo. Fonte: Elaboração da autora (2020).

Durante a infecção fúngica, foi possível verificar diferenças significativas para *MIR169* e *MIR172*. *MIR169* teve uma grande indução da expressão no início da infecção, no ponto de 6 hai, sendo o dobro em relação ao grupo controle. A expressão relativa do *MIR172* foi reprimida no início da infecção, em 6 (1,2 vezes) e 12 (1,2 vezes) horas após a inoculação. Contudo, *MIR164* não apresentou diferenças significativas quando comparado entre os grupos controle e infectado (Figura 10 e Apêndice A).

As análises de variações dentro dos grupos no decorrer dos tempos analisados (Apêndice A) demonstram que *MIR164* apresentou significativa redução de expressão gênica no tempo de 6 para 12 hai e, posteriormente, foi novamente reprimido às 24 e 48 hai, no grupo controle. Já para o grupo infectado, observa-se uma redução significativa da expressão gênica dos tempos 6 e 12 hai para os tempos 24 e 48 hai. *MIR169* manifestou uma menor expressão gênica em 6 hai, quando comparado aos outros tempos no grupo controle. Contudo, nenhuma diferença foi observada entre os tempos no grupo infectado. Plantas infectadas com *A. brassicicola* apresentaram diferença na expressão gênica do *MIR172* entre os tempos 12 e 24 hai. Já o grupo controle apresentou diferenças na expressão desse gene entre os tempos 6 e 12 hai. .

Figura 10 - Expressão relativa de miRNAs candidatos em *A. thaliana* nos grupos controle e infectado com *A. brassicicola*.



(A) *MIR164*, (B) *MIR169* e (C) *MIR172*. Grupo controle está representado pela cor verde e grupo infectado com *A. brassicicola* em vermelho. Análise de PCR quantitativa em tempo real pelo método de expressão relativa $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os valores foram normalizados com os genes de referência *MIR159* e *MIR396*. Foram utilizadas triplicatas biológicas e técnicas para a PCR quantitativa em tempo real. Diferenças estatísticas entre grupo infectado e controle ($p < 0,05$) estão destacadas com asterisco (*). Fonte: Elaboração da autora (2020).

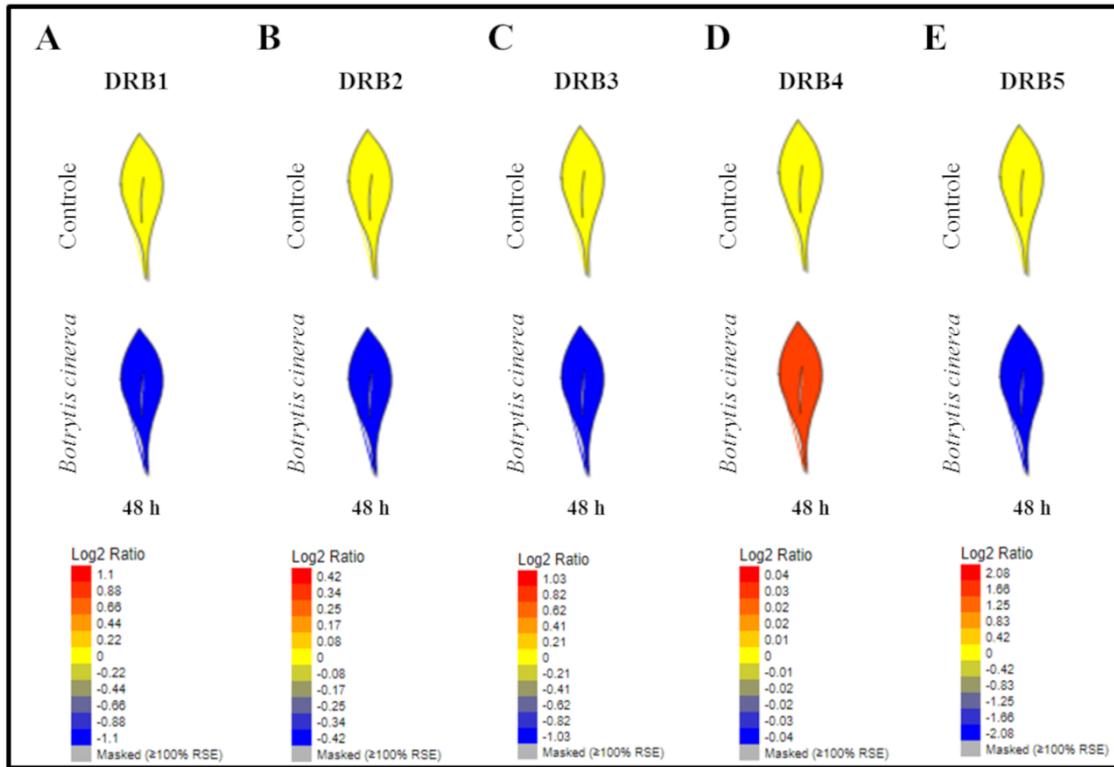
7.5 ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DAS DRBs EM BANCO DE DADOS PÚBLICOS

A ferramenta *Tissue and Experiment eFP Viewer*, do *ePlant* fornece informações detalhadas sobre a expressão gênica em tecidos individuais e os resultados de experimentos de resposta a perturbações. Das 22 visualizações neste módulo, oito se referem a estresses bióticos, sendo quatro para espécies fúngicas (*Botrytis cinerea*, *Erysiphe orontii*, *Golovinomyces orontii* e *Hyaloperonospora arabidopsidis*), um oomiceto (*Phytophthora infestans*), uma bactéria (*Pseudomonas syringae*), um afídeo (*Myzus persicae*) e um experimento com elicitores.

Considerando os experimentos realizados com fungos patogênicos, foram escolhidos para análise aqueles que utilizaram a mesma cinética proposta no presente trabalho. Além disso, visando abordar os três estilos de vida dos organismos fitopatogênicos, analisou-se também os dados obtidos com experimentos com um oomiceto (*P. infestans*). Sendo assim, foram analisadas a espécies *B. cinerea* (necrotrófico), *E. orontii* (biotrófico) e *P. infestans* (hemibiotrófico).

Os resultados obtidos para *B. cinerea* demonstram que os genes DRBs foram reprimidos em 48 hai, com exceção de *DRB4*, que sofreu uma leve indução (de 0 para 0,04) em relação ao grupo controle (Figura 11).

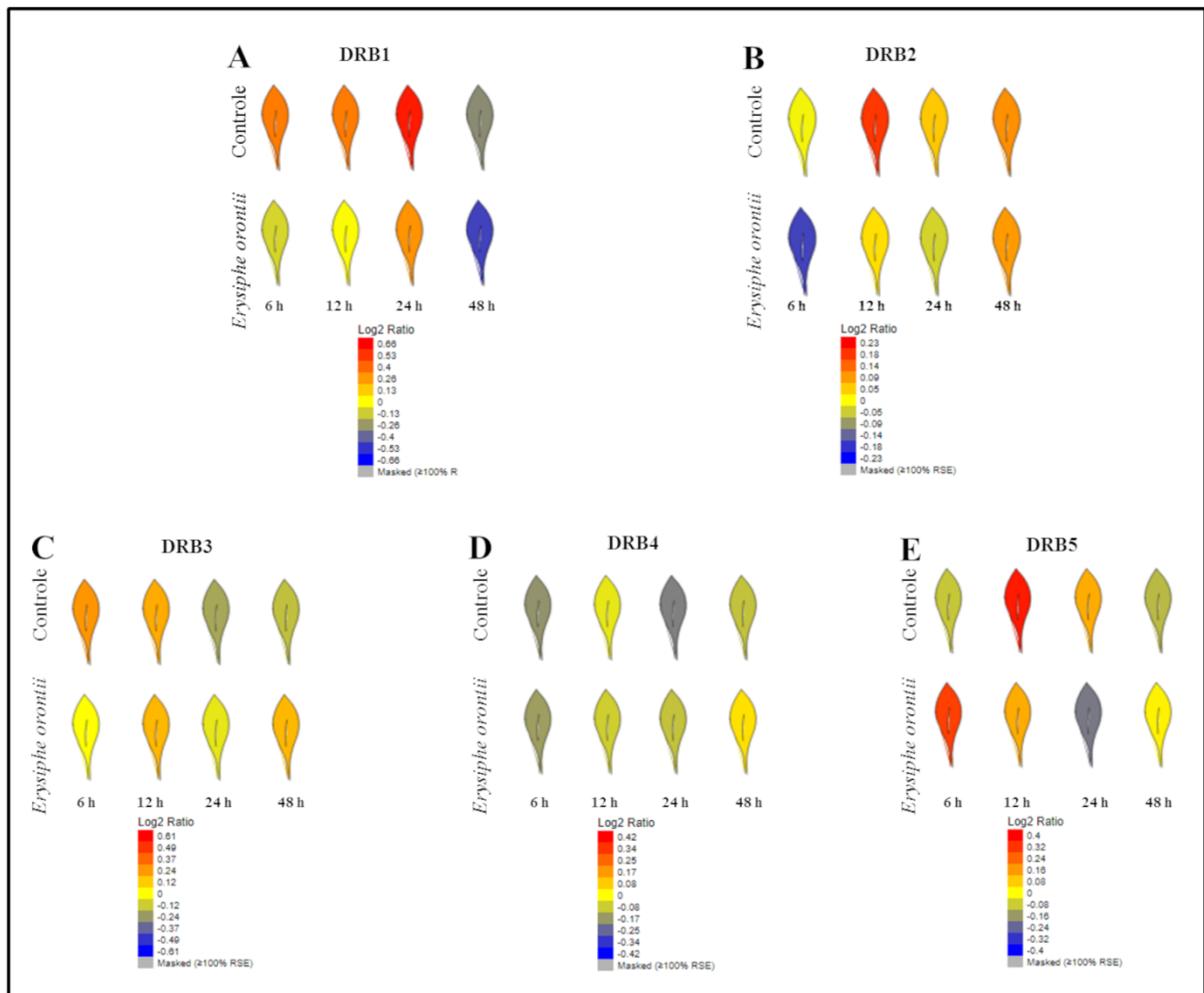
Figura 11 - Expressão gênica dos cinco genes *DRBs* em *A. thaliana* infectada com *B. cinerea*.



(A) *DRB1*, (B) *DRB2*, (C) *DRB3*, (D) *DRB4* e (E) *DRB5*. Dados disponíveis no banco *ePlant*, depositados por outros grupos, obtidos através de análises de microarranjo. Folhas de *A. thaliana* Col-0 com 4 semanas foram inoculadas com 4-5 gotas de *B. cinerea*. Plantas cresceram sob condições de 12 horas de luz, durante 48 horas. Todas as medidas foram realizadas em triplicata. O RNA foi isolado e hibridizado em chips ATH1 GeneChip. Folhas em vermelho representam maior expressão gênica, enquanto folhas em azul demonstram menor expressão. Fonte: Adaptado de *ePlant* (WAESE et al., 2017).

O padrão de expressão dos genes DRB durante infecção com *E. orontii* foi bastante particular para cada gene. *DRB1* foi levemente reprimido em todos os tempos analisados, assim como *DRB2*. *DRB3* foi reprimido em 6 (de 0,24 para 0) e 12 hai (0,24 para 0,12), contudo, foi induzido ao final da infecção, em 24 (de -0,24 para -0,12) e 48 hai (de -0,12 para 0,12). *DRB4* foi levemente reprimido em 12 hai, mas foi induzido nos tempos 6, 24 e 48 hai. Entretanto, a expressão de *DRB5* foi bastante variada ao longo da infecção, na qual houve indução em 6 horas (de -0,08 para 0,32), sendo reprimido em 12 (de 0,4 para 0,16) e 24 hai (de 0,16 para -0,16), voltando a ser induzido em 48 hai (de -0,08 para 0) (Figura 12).

Figura 12 - Expressão gênica dos cinco genes *DRBs* em *A. thaliana* infectada com *E. orontii*.

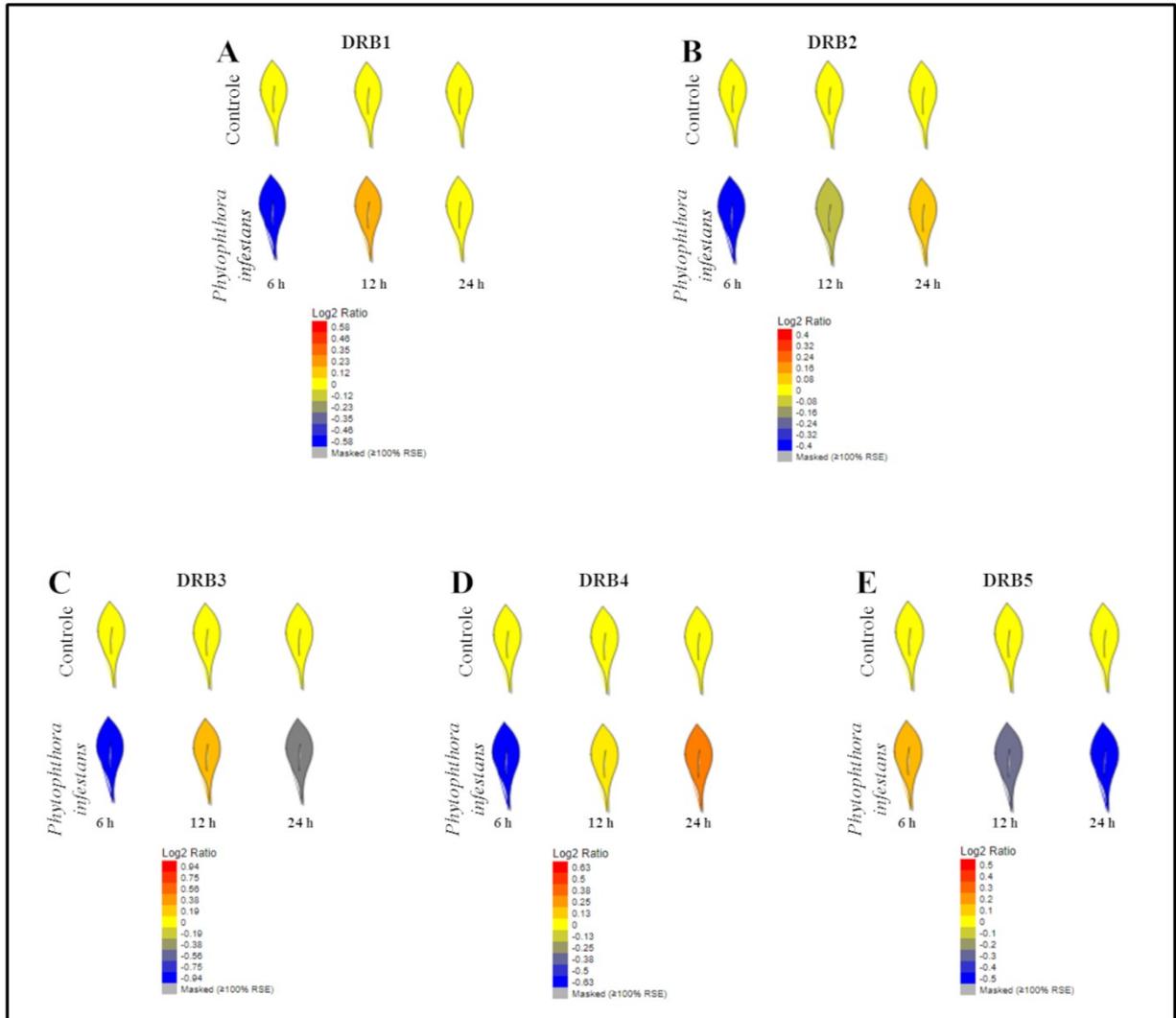


(A) *DRB1*, (B) *DRB2*, (C) *DRB3*, (D) *DRB4* e (E) *DRB5*. Dados disponíveis no banco *ePlant*, depositados por outros grupos, obtidos através de análises de microarranjo. Folhas de *A. thaliana* Col-0 com 4 semanas foram inoculadas com *E. orontii* com 10 dias de crescimento. Plantas cresceram sob condições de 12 horas de luz, onde as coletas foram realizadas durante a metade do período luminoso. Todas as medidas foram realizadas em triplicata. O RNA foi isolado e hibridizado em chips ATH1 GeneChip. Folhas em vermelho representam maior expressão gênica, enquanto folhas em azul demonstram menor expressão. Fonte: Adaptado de *ePlant* (WAESE et al., 2017).

Assim como em *E. orontii*, o perfil de expressão gênica das *DRBs* variou em *P. infestans*. *DRB1* foi reprimido em 6 horas (de 0 para -0,58), sofreu uma leve indução em 12 h (de 0 para 0,23) e não variou em 24 h. *DRB2* foi reprimido nos tempos iniciais (6 e 12 h), enquanto *DRB3* foi reprimido em 6 (de 0 para -0,94) e 24 h (de 0 para -0,38), mas teve indução em 12 h (0,38). *DRB4*, por sua vez, também sofreu repressão em 6 horas (-0,63), mas foi induzido em 24 h (de 0 para 0,38), ao contrário de *DRB5*, que foi sutilmente induzido em

6 h (de 0 para 0,2), mas sofreu repressão nos tempos finais, em 12 (de 0 para -0,3) e 24 (de 0 para -0,5). (Figura 13).

Figura 13 - Expressão gênica dos cinco genes *DRBs* em *A. thaliana* infectada com *P. infestans*.



(A) *DRB1*, (B) *DRB2*, (C) *DRB3*, (D) *DRB4* e (E) *DRB5*. Dados disponíveis no banco *ePlant*, depositados por outros grupos, obtidos através de análises de microarranjo. Folhas de *A. thaliana* Col-0 com 5 semanas foram inoculadas com *P. infestans*. Plantas cresceram sob condições de 8/16 horas de luz/escuro. Todas as medidas foram realizadas em triplicata. O RNA foi isolado e hibridizado em chips ATH1 GeneChip. Folhas em vermelho representam maior expressão gênica, enquanto folhas em azul demonstram menor expressão. Fonte: Adaptado de *ePlant* (WAESE et al., 2017).

8 DISCUSSÃO

O silenciamento gênico é um dos mecanismos de defesa vegetal contra organismos potencialmente patogênicos. Em plantas, pequenos RNAs, como miRNAs e siRNAs, reprimem a expressão gênica, guiando o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) para mRNAs alvos, levando ao silenciamento gênico pela sua degradação ou inibição da tradução. A biogênese dos sRNAs envolve diversas proteínas e enzimas, dentre elas, as DRBs. Apesar de já confirmada a participação de alguns membros dessa família proteica na defesa contra infecções virais e bacterianas, ainda é desconhecido o seu envolvimento nas relações plantas x fungos patogênicos. Uma vez que esses organismos são os principais fitopatógenos, é importante analisar se há modulação dos genes *DRBs* para tentar compreender sua função e qual a sua importância nas respostas vegetais contra organismos patogênicos.

Ao analisar diferentes patossistemas, buscou-se identificar um padrão de expressão dos genes *DRBs* comparando grupos infectados com grupos controles ao longo de uma cinética de infecção. Contudo, tanto nos experimentos realizados no laboratório, quanto nas análises *in silico*, foram observadas diferenças particulares no perfil de expressão desses genes dentro de cada patossistema, não sendo possível estabelecer um padrão entre eles. As diferenças entre os mecanismos de infecção podem influenciar na singularidade do perfil de expressão dos genes analisados.

O processo infeccioso de *Alternaria*, fungo necrotrófico, é bastante similar entre as espécies do gênero (AVELING; SNYMAN; RIJKENBERG, 1994; SHARMA et al., 2014). Os conídios germinam dentro de 12 e 24 horas após a inoculação, formando tubos germinativos que crescem em qualquer direção através da superfície foliar e, geralmente, terminam em um apressório bulboso. Após 24 horas, os apressórios formam hifas primárias bulbosas abaixo do apressório na célula epidérmica ou entre as paredes celulares das células adjacentes. As hifas secundárias se desenvolvem a partir das hifas primárias 48 h após a inoculação, crescendo dentro dos espaços intercelulares onde causam a morte do tecido hospedeiro (AVELING; SNYMAN; RIJKENBERG, 1994) (Figura 14).

Interessantemente, apenas *DRB2* não apresentou diferenças entre o grupo controle e infectado com *A. brassicicola*. Contudo, as variações de cada gene ocorreram em momentos distintos da infecção. *DRB1* foi modulada 6 horas após a inoculação, momento em que os conídios estão produzindo toxinas, antes mesmo de penetrarem nas células vegetais

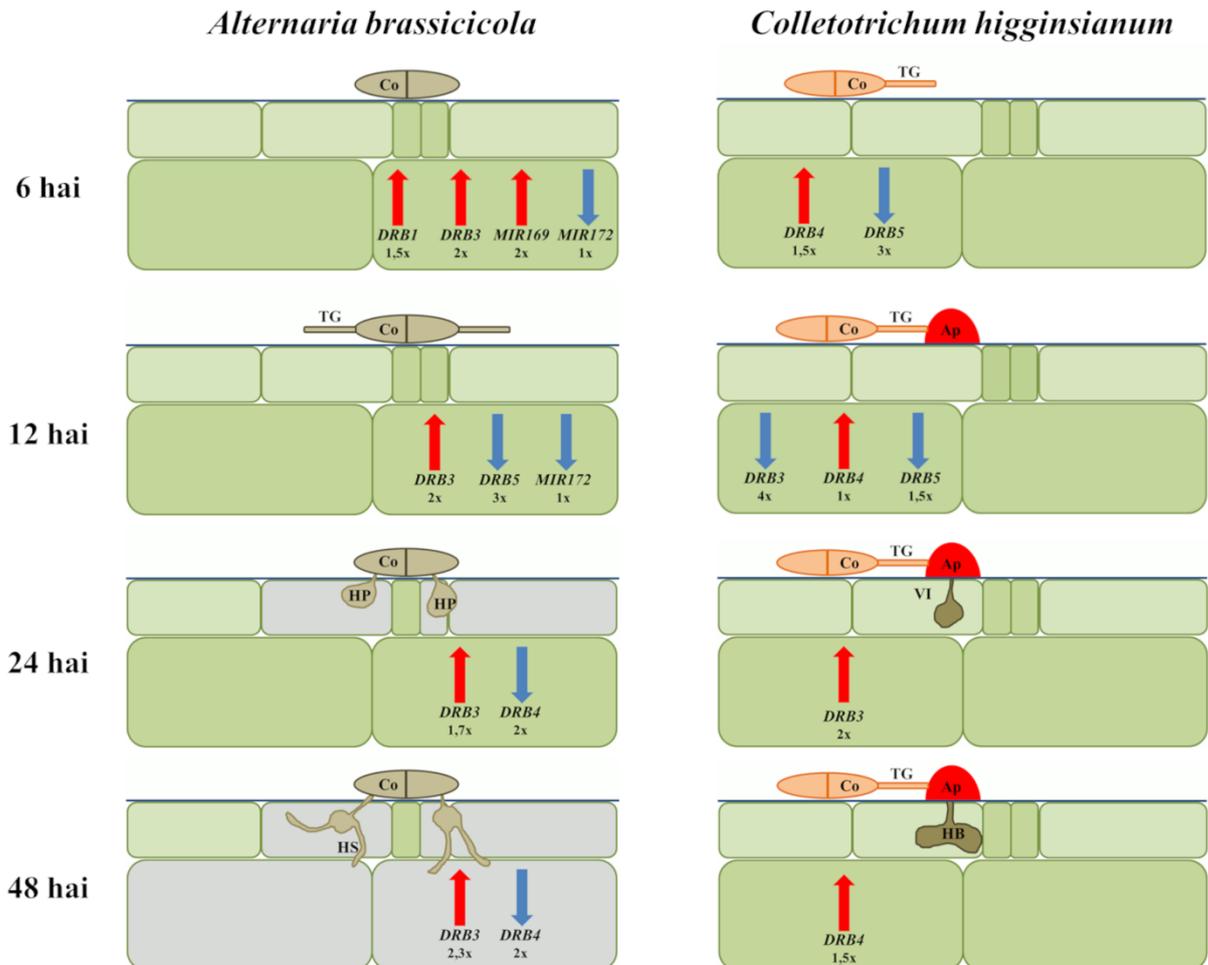
(DEHPOUR; ALAVI; MAJD, 2007). Sendo a função da DRB1 participar na biogênese de miRNAs que, por sua vez, regulam a expressão de mRNA alvos, a sua indução no início da infecção pode sugerir a ativação da produção de miRNAs reguladores de fatores de transcrição e outros componentes de sinalização, em resposta à percepção de sinal frente ao ataque fúngico. *DRB5* foi fortemente reprimido no tempo seguinte, 12 horas após a inoculação, onde há a formação dos tubos germinativos. *DRB4* foi fortemente reprimido nos tempos finais da infecção, que estão relacionados à formação e desenvolvimento de hifas e, conseqüentemente, ao avanço da doença. *DRB3* foi diferencialmente expresso em todos os tempos analisados, tornando-se o principal candidato nas respostas contra infecção por *A. brassicicola*.

Caracteristicamente, o processo infeccioso de *Colletotrichum* possui a formação de uma série de tipos de células especializadas associadas à infecção hemibiotrófica (PERFECT et al., 1999). Inicialmente, há a fase biotrófica onde, dentro das células epidérmicas do hospedeiro, o fungo diferencia as hifas primárias bulbosas (Figura 4), que expandem e invaginam a membrana plasmática do hospedeiro. Aproximadamente 24 horas após a penetração inicial, as células infectadas morrem e *C. higginsianum* muda para um crescimento necrotrófico, onde ocorre a mudança para hifas secundárias finas e filamentosas que emergem das pontas das hifas primárias, degradam as paredes celulares, invadindo as células adjacentes e rapidamente colonizam e matam o tecido hospedeiro (O'CONNELL et al., 2012) (Figura 14). Interessantemente, foi possível observar um aumento expressivo nesse ponto para *DRB3*, que é reprimido em 12 horas, mas altamente induzido em 24 horas, o que pode representar uma resposta à mudança morfológica das hifas e do mecanismo de infecção do patógeno. Esse aumento de expressão 24 horas também é encontrado para *DRB4*.

A Figura 14 sintetiza os resultados dessa pesquisa. Nela, é possível comparar as modulações dos genes analisados nos diferentes patossistemas ao longo das infecções. Um primeiro ponto a ser levantado é que *DRB3*, *DRB4* e *DRB5*, aparentemente, são os principais membros dessa família proteica envolvidos nos mecanismos de resposta às infecções fúngicas, considerando a modulação desses genes em ambos os patossistemas e em diferentes tempos. Outro aspecto a ser ressaltado é a diferença na modulação dos genes entre os patossistemas. Enquanto a expressão de *DRB4* é reprimida durante a infecção por *A. brassicicola*, em plantas infectadas por *C. higginsianum* esse gene foi induzido. Apesar dos resultados evidenciarem a participação desse gene nos mecanismos de defesa contra patógenos, não é possível ilustrar a sua função dentro do mecanismo. Observa-se também que

em ambos os patossistemas, *DRB5* foi reprimido. Contudo, essa repressão ocorreu apenas nos estágios iniciais da infecção, sugerindo uma nova função para essa proteína.

Figura 14 – Estágios do processo de infecção de *A. brassicicola* e *C. higginsianum* e resultados de expressão gênica das *DRBs* e *miRNAs* em 6, 12, 24 e 48 horas após a inoculação.



Os esquemas representam o processo de infecção de *A. brassicicola* (conídio marrom) e *C. higginsianum* (conídio laranja) nos tempos analisados. Em verde, estão representadas as células hospedeiras vivas e em cinza, células mortas pelo patógeno. Setas vermelhas representam os genes induzidos durante a infecção, enquanto setas azuis apresentam os genes reprimidos. Co: conídio, TG: tubo germinativo, Ap: apressório, VI: Vesícula infecciosa, HP: hifas primárias, HS: hifas secundárias, HB: hifas biotróficas, HN: hifas necrotróficas. Fonte: Elaboração da autora (2020).

A partir dos experimentos realizados com *A. brassicicola* e *C. higginsianum*, não foi possível determinar um padrão de modulação dos genes *DRBs* ao longo da cinética utilizada. Dessa forma, buscou-se dados de outros patossistemas no banco de dados disponível para *A.*

thaliana, *ePlant*. Para isso, foram considerados os experimentos com espécies fúngicas produzidos a partir da mesma cinética de tempo utilizada nos experimentos com *A. brassicicola* e *C. higginsianum*. Apesar dos experimentos abordarem os mesmos tempos, a expressão dos genes foi detectada via microarranjos. Contudo, dos oito experimentos disponíveis no banco, apenas três correspondiam aos critérios utilizados. Assim, foram analisados os dados para *B. cinerea*, *E. orontii* e *P. infestans*.

B. cinerea é um fungo necrotrófico e sua infecção inicia com a germinação dos conídios, que começam a secretar fatores indutores de necrose. Entre 24 e 48 horas após a infecção, as plantas liberam metabólitos antifúngicos, desencadeando a morte celular programada no desenvolvimento de hifas, matando a maioria das células fúngicas (SHLEZINGER et al., 2011). Ao analisar os resultados obtidos no *ePlant* para *B. cinerea*, observa-se indução de *DRB4* em 48 horas, fase onde a planta está liberando metabólitos indutores de necrose fúngica, sugerindo a participação dessa proteína na defesa contra *B. cinerea*.

Em infecções por fungos biotróficos, como *E. orontii*, não há a morte do tecido hospedeiro, ao contrário dos casos supracitados. O processo infeccioso dessa espécie inicia com a germinação do conídio e o desenvolvimento do tudo germinativo e apressório, até 6 hai. De 6 a 10 hai, o apressório desenvolve uma haste de penetração longa e fina, que posteriormente penetra na célula epidérmica. De 10 até 14 hai, há a formação do haustório, uma estrutura especializada na absorção de nutrientes do hospedeiro, a partir do conteúdo citoplasmático. Após 24 horas, o haustório se desenvolve, com expansão dos lobos, aumentando a sua absorção de nutrientes da célula vegetal (KOH et al., 2005). Interessantemente, ao comparar os resultados obtidos através dos dados disponíveis no *ePlant*, observa-se que *DRB3* e *DRB4* apresentaram pouca modulação durante a infecção biotrófica causada por *E. orontii*, ao contrário dos resultados para fungos necrotróficos. *DRB1* e *DRB2* foram reprimidos em todos os tempos no grupo infectado e *DRB5* foi induzido em 6 e 48 e reprimido em 12 e 24 hai. Esses resultados demonstram que o processo infeccioso de patógenos biotróficos modulam as DRBs de maneira distinta aos necrotróficos.

P. infestans é um oomiceto hemibiotrófico, que possui vias de reprodução assexuada e sexuada. Esse fitopatógeno libera diversos efetores importantes para a colonização e promoção da patogenicidade (VETUKURI et al., 2012). Os dados de microarranjo obtidos no *ePlant* demonstram que todos os genes *DRB*, com exceção de *DRB5*, foram reprimidos 6 horas após a inoculação com *P. infestans*. *DRB1* e *DRB3* apresentaram indução em 12 h,

enquanto *DRB2* e *DRB4* foram induzidos em 24h. *DRB5* ao contrario dos outros genes, foi reprimido em 12 e 24 hai. Esses resultados também sugerem a atuação das DRBs em momentos distintos da infecção. Entretanto, não se sabe de que forma elas estão atuando nas respostas contra os ataques dos fitopatógenos.

Mediante o exposto, os resultados apontam que *DRB3* e *DRB4* são os genes mais promissores nas respostas durante infecção fúngica, visto que esses genes foram fortemente modulados em todos os patossistemas analisados. Raja e colaboradores (2014), demonstraram a participação da *DRB3* na defesa mediada por metilação contra DNA viral, através da inoculação com *Beet curly top virus* (BCTV) em mutantes *drb2*, *drb3*, *drb4* e *drb*. Nesse trabalho, 21 dias após a inoculação, apenas mutantes *drb3* não conseguem se recuperar da infecção por geminivírus, ou seja, os tecidos que surgem após o estabelecimento de uma infecção sistêmica não apresentam remissão dos sintomas, exibindo um fenótipo atrofiado, com deformação floral e ausência de siliquis. No presente trabalho, *DRB3* foi induzido em todos os tempos analisados com *A. brassicicola* e sofreu modulação em *C. higginsianum*, demonstrando estar participando de respostas da planta em relação à infecção fúngica.

Também já foi relatada a participação da *DRB4* na resistência contra *Turnip crinkle virus* (TCV) (ZHU et al., 2013), comprovada através da inoculação do TCV em progênieis resistentes resultantes do cruzamento de mutante *drb4* background Col-0 com uma linhagem Di-17, resistente ao TCV. Após a inoculação, observou-se que, apesar de possuir o gene de resistência *HRT* (*hypersensitive response to TCV*), as plantas *HRT drb4* apresentavam o mesmo fenótipo da planta Col-0, susceptível à infecção, demonstrando a participação da *DRB4* na defesa contra infecção viral.

Interessantemente, em ambas as infecções, houve diferenças significativas na expressão de *DRB5*. Embora as funções dessa proteína ainda não estejam elucidadas, os resultados dessa pesquisa sugerem sua participação em resposta a fungos patogênicos, sendo necessários mais estudos a fim de confirmar o seu papel nesse mecanismo de defesa vegetal.

Ainda que tenham sido encontradas diferenças na expressão gênica das DRBs em resposta às infecções fúngicas analisadas, a forma com que essas proteínas estão sendo moduladas durante o processo infeccioso ainda permanece desconhecida. Além disso, o presente trabalho analisou tecidos foliares. Contudo, sabe-se que *DRB3* e *DRB5* apresentam maior expressão em tecidos meristemáticos. Sendo assim, sugere-se novas análises em diferentes tecidos, a fim de confirmar a participação dessas proteínas em mecanismos de

resposta contra fungos. Não somente, faz-se necessária a investigação em plantas mutantes, com intuito de elucidar a sua efetiva função durante a infecção.

Por outro lado, é bastante clara a importância da DRB1 na biogênese de miRNAs. DRB1 e DCL1 atuam no processamento preciso de miRNAs de seus transcritos precursores antes de serem transferidos para o complexo RISC (EAMENS et al., 2009; HAN et al., 2004). Durante a infecção com *A. brassicicola*, DRB1 apresentou indução na expressão em 6 hai. Interessantemente, o mesmo perfil de indução nos tempos iniciais da infecção foi observado também em *MIR164* e *MIR169*.

MIR164 regula negativamente, através da clivagem do mRNA, um subconjunto de membros da família de fatores de transcrição NAC (SIEBER et al., 2007; WU et al., 2018). Chand e colaboradores (2016) observaram uma repressão do *MIR164* em *Curcuma longa* infectada com o fungo *Pythium aphanidermatum*, e sugerem que o aumento da expressão de NAC pode facilitar a colonização do fungo através da inibição da resposta de hipersensibilidade. Os resultados obtidos no presente trabalho, ainda que não sejam estatisticamente significativos, demonstram que, em 6 e 12 hai, há um aumento na expressão de *MIR164*, implicando na diminuição de NAC, o que pode contribuir para as respostas de defesa vegetal no início da infecção.

Durante a infecção por *A. brassicicola*, observa-se a indução da expressão de *MIR169* no início da infecção. A família miR169 possui um papel importante nas respostas vegetais contra estresses abióticos e bióticos. Nas plantas, os principais alvos do *MIR169* são os genes que codificam a subunidade A do fator nuclear Y (NF-Y). Genes *NF-YA* estão geralmente associados a estresses abióticos, tanto em monocotiledôneas, quanto em dicotiledôneas (LEYVA-GONZÁLEZ et al., 2012; LI et al., 2008; LIANG; HE; YU, 2012; LUAN et al., 2015). Contudo, em arroz, *MIR169* atua como um regulador negativo da imunidade contra o fungo *Magnaporthe oryzae*, no qual a sua superexpressão leva à supressão de seus genes-alvo e aumento da suscetibilidade ao patógeno (LI et al., 2017). Dessa forma, para confirmar se o aumento da expressão de *MIR169* no início da infecção por *A. brassicicola* conduz à susceptibilidade de Arabidopsis ao patógeno, sugere-se analisar respostas de defesa, incluindo genes relacionados à patogenicidade, bem como análise do mRNA alvo.

Em Arabidopsis, MIR172 possui como alvo o mRNA *AP2 (APETALA)*, que envolve desenvolvimento floral. Ao contrário da maioria dos miRNAs, que participam do silenciamento de RNA através da clivagem do mRNA alvo, *MIR172* regula o seu alvo através

da inibição da tradução, reprimindo a expressão de *AP2* durante o desenvolvimento da flor (CHEN, 2004). Os resultados obtidos demonstram repressão do *MIR172* nos estágios iniciais da infecção, sugerindo o aumento da expressão de *AP2*. Tais dados condizem com o estágio de desenvolvimento vegetal no momento da infecção, uma vez que as plantas foram infectadas com *A. brassicicola* com cinco semanas de crescimento, estágio em que as primeiras inflorescências estão se desenvolvendo. Samad e colaboradores (2016) observaram que *MIR172* é responsivo a tratamentos por fungos patogênicos, uma vez que houve indução desse gene em plantas de *Persicaria minor* infectadas por *Fusarium oxysporum*, sugerindo que a modulação desse miRNA seja crucial em resposta a essa infecção fúngica e levará à supressão do fator de transcrição *AP2*, que está envolvido no desenvolvimento da planta.

Este estudo forneceu novas informações quanto ao padrão de expressão de alguns miRNAs durante a infecção fúngica. De modo geral, observou-se modulações apenas nos estágios iniciais da infecção, sugerindo que as respostas da planta frente à infecção por *A. brassicicola* podem estar ocorrendo em decorrência das toxinas e enzimas de infecção liberadas pelo patógeno no início do processo infeccioso.

Em suma, foi possível constatar modulações na expressão gênica de alguns miRNAs e dos genes *DRBs* durante infecção por fungos patogênicos. No entanto, não é possível afirmar qual o papel dessas proteínas nos mecanismos de defesa e se elas estão efetivamente participando das respostas vegetais durante a interação planta-patógeno, uma vez que não foram empregadas técnicas de genômica funcional. Dessa forma, sugerem-se futuras análises em mutantes *drbs* para confirmar a participação dessas proteínas nas respostas contra patógenos fúngicos. Além disso, ressalta-se a importância também de análises em outros tecidos vegetais, levando em consideração que algumas dessas proteínas apresentam maior expressão em outros tecidos, como flores e sementes.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo analisou a expressão gênica das proteínas DRBs e de alguns miRNAs em *A. thaliana* durante infecção pelos fungos *A. brassicicola* e *C. higginsianum*.

Os resultados obtidos demonstram que os genes *DRBs* são modulados frente a infecções fúngicas, bem como alguns miRNAs. Contudo, o perfil de modulação é particular para cada gene e em cada patossistema, e não foi possível estabelecer um padrão de expressão em relação ao estilo de vida do patógeno.

A modulação da expressão gênica de *DRB5* observada durante infecção fúngica, sugere um potencial papel dessa proteína durante interação planta-fungo patogênico. Este dado é bastante relevante uma vez que esse gene não apresenta uma função bem estabelecida.

Além disso, os resultados obtidos para *DRB3* e *DRB4* durante infecção pelos fungos *A. brassicicola* e *C. higginsianum*, sugerem a participação desses genes como as principais DRBs na via de resposta a infecções fúngicas, uma vez que sua função já foi estabelecida em infecções virais e bacterianas.

Contudo, apesar de existir modulações da expressão gênica das DRBs em ambos os patossistemas estudados, a função destas proteínas na via de resposta a fungos patogênicos ainda necessita ser validada com estudos envolvendo técnicas de genômica funcional, a fim de elucidar o seu papel em respostas vegetais durante infecções fúngicas.

REFERÊNCIAS

- ADENOT, Xavier et al. DRB4-Dependent TAS3 trans-Acting siRNAs Control Leaf Morphology through AGO7. **Current Biology**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. 927–932, 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982206013327>>
- ANAND, Mayank et al. Physiological and Molecular Plant Pathology Plant disease resistance genes : Current status and future directions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 78, p. 51–65, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2012.01.002>>
- ANDARGIE, Mebeasselassie; LI, Jianxiong. Arabidopsis thaliana: A Model Host Plant to Study Plant–Pathogen Interaction Using Rice False Smut Isolates of *Ustilaginoidea virens*. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 7, n. February, p. 1–10, 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2016.00192/abstract>>
- AVELING, T. A. S.; SNYMAN, H. G.; RIJKENBERG, F. H. J. Morphology of infection of onion leaves by *Alternaria porri*. **Canadian Journal of Botany**, [s. l.], v. 72, n. 8, p. 1164–1170, 1994.
- BARI, Rajendra; JONES, Jonathan D. G. Role of plant hormones in plant defence responses. **Plant Molecular Biology**, [s. l.], v. 69, n. 4, p. 473–488, 2009.
- BARTON, Deborah A. et al. Live cell imaging reveals the relocation of dsRNA binding proteins upon viral infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 435–443, 2017. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/MPMI-02-17-0035-R>>
- BELMAS, Elodie et al. Genome Sequence of the Necrotrophic Plant Pathogen *Alternaria brassicicola* Abra43. **American Society for Microbiology Journals**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 1–2, 2018.
- BERARDINI, Tanya Z. et al. The arabidopsis information resource: Making and mining the “gold standard” annotated reference plant genome. **genesis**, [s. l.], v. 53, n. 8, p. 474–485, 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/dvg.22877>>
- BREAKFIELD, Natalie W. et al. High-resolution experimental and computational profiling of tissue-specific known and novel miRNAs in Arabidopsis. **Genome Research**, [s. l.], v. 22, p. 163–176, 2012.
- BRODERSEN, Peter et al. Widespread Translational Inhibition by Plant miRNAs and siRNAs. **Science**, [s. l.], v. 320, n. 5880, p. 1185–1191, 2008.
- BRUNNER, Amy M.; YAKOVLEV, Igor A.; STRAUSS, Steven H. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. **BMC Plant Biology**, [s. l.], v. 4, p. 1–7, 2004.
- CAMARGO-RAMÍREZ, Rosany; VAL-TORREGROSA, Beatriz; SAN SEGUNDO, Blanca. MiR858-Mediated Regulation of Flavonoid-Specific MYB Transcription Factor Genes

Controls Resistance to Pathogen Infection in Arabidopsis. **Plant & cell physiology**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 190–204, 2018.

CANNON, P. F. et al. Colletotrichum – current status and future directions. **Studies in Mycology**, [s. l.], v. 73, p. 181–213, 2012.

CHAND, Subodh Kumar et al. Identification and characterization of microRNAs in turmeric (*Curcuma longa* L.) responsive to infection with the pathogenic fungus *Pythium aphanidermatum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 93, p. 119–128, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2016.01.010>>

CHAND, Subodh Kumar et al. Multiple garlic (*Allium sativum* L.) microRNAs regulate the immunity against the basal rot fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cepae*. **Plant Science**, [s. l.], v. 257, p. 9–21, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.01.007>>

CHEN, Caifu et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. **Nucleic acids research**, [s. l.], v. 33, n. 20, p. e179, 2005. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gni178>>

CHEN, Xuemei. A MicroRNA as a Translational Repressor of APETALA2 in Arabidopsis Flower Development. **Science**, [s. l.], v. 303, n. 5666, p. 2022–2025, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1088060>>

CHO, Yangrae. How the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola* kills plant cells remains an Enigma. **Eukaryotic Cell**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 335–344, 2015.

CLAVEL, Marion et al. Evolutionary history of double-stranded RNA binding proteins in plants: identification of new cofactors involved in easiRNA biogenesis. **Plant Molecular Biology**, [s. l.], v. 91, n. 1–2, p. 131–147, 2016.

CURTIN, Shaun J. et al. The roles of plant dsRNA-binding proteins in RNAi-like pathways. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 582, n. 18, p. 2753–2760, 2008.

CZECHOWSKI, Tomasz et al. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. **Plant physiology**, [s. l.], v. 139, n. 1, p. 5–17, 2005. Disponível em: <<http://arxiv.org/abs/1409.2752%5Cnhttp://www.arxiv.org/pdf/1409.2752.pdf>>

DALLERY, Jean-Felix. **NPC – Natural Products of Colletotrichum higginsianum**. 2018. Disponível em: <<http://pilotunit.com/projects/lab-projects/npc>>. Acesso em: 24 out. 2018.

DE FREITAS, Mateus B. et al. Ulvans induce resistance against plant pathogenic fungi independently of their sulfation degree. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 133, p. 384–390, 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861715006840>>

DEHPOUR, A. A.; ALAVI, S. V.; MAJD, A. Light and Scanning Electron Microscopy Studies on the Penetration and Infection Processes of *Alternaria Alternata*, Causing Brown Spot on *Minneola* Tangelo in the West Mazandaran -Iran. **World Applied Sciences Journal**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 68–72, 2007.

DICKINSON, Matthew. **Molecular Plant Pathology**. 1st Editio ed. [s.l.] : Garland Science,

2003.

DING, Shou-wei; VOINNET, Olivier. Antiviral Immunity Directed by Small RNAs. **Cell**, [s. l.], v. 130, n. 3, p. 413–426, 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867407009774>>

DODDS, Peter N.; RATHJEN, John P. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. **Nature Publishing Group**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 539–548, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrg2812>>

DONG, Z.; HAN, M. H.; FEDOROFF, N. The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 105, n. 29, p. 9970–9975, 2008.

EAMENS, Andrew L. et al. The Arabidopsis thaliana double-stranded RNA binding protein DRB1 directs guide strand selection from microRNA duplexes. **RNA**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 2219–2235, 2009. Disponível em: <<http://rnajournal.cshlp.org/cgi/doi/10.1261/rna.1646909>>

EAMENS, Andrew L. et al. DRB2 Is Required for MicroRNA Biogenesis in Arabidopsis thaliana. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. e35933, 2012.

EAMENS, Andrew L.; CURTIN, Shaun J.; WATERHOUSE, Peter M. The Arabidopsis thaliana Double-Stranded RNA Binding (DRB) Domain Protein Family. In: ERDMANN, Volker A.; BARCISZEWSKI, Jan (Eds.). **Non Coding RNAs in Plants**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 385–406.

EAMENS, Andrew L.; KIM, Ki Wook; WATERHOUSE, Peter M. DRB2, DRB3 and DRB5 function in a non-canonical microRNA pathway in Arabidopsis thaliana. **Plant Signaling and Behavior**, [s. l.], v. 7, n. 10, p. 1224–1229, 2012.

ERDMANN, Volker A.; BARCISZEWSKI, Jan (EDS.). **Non Coding RNAs in Plants**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-19454-2>>

ERRAKHI, Rafik et al. Anion channel activity is necessary to induce ethylene synthesis and programmed cell death in response to oxalic acid. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 59, n. 11, p. 3121–3129, 2008.

FANG, Yuda; SPECTOR, David L. Identification of Nuclear Dicing Bodies Containing Proteins for MicroRNA Biogenesis in Living Arabidopsis Plants. **Current Biology**, [s. l.], v. 17, n. 9, p. 818–823, 2007.

GEISLER-LEE, Jane et al. A Predicted Interactome for Arabidopsis. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 145, n. 2, p. 317–329, 2007. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.107.103465>>

GLAZEBROOK, Jane; ROGERS, E. E.; AUSUBEL, Frederick M. Use of Arabidopsis for genetic dissection of plant defense responses. **Annual review of genetics**, [s. l.], v. 31, p. 547–69, 1997.

- GUPTA, Om Prakash et al. MicroRNA regulated defense responses in *Triticum aestivum* L. during *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* infection. [s. l.], p. 817–824, 2012.
- GUPTA, Om Prakash et al. Current status on role of miRNAs during plant e fungus interaction. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 85, p. 1–7, 2014.
- HAN, M. H. et al. The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 101, n. 4, p. 1093–1098, 2004.
- HUSER, Aurélie et al. Discovery of Pathogenicity Genes in the Crucifer Anthracnose Fungus *Colletotrichum higginsianum*, Using Random Insertional Mutagenesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 143–156, 2009.
- JIN, Weibo; WU, Fangli; XIAO, Liang. Microarray-based Analysis of Tomato miRNA Regulated by *Botrytis cinerea*. [s. l.], p. 38–46, 2012.
- KNOGGE, W. Fungal Infection of Plants. **the Plant Cell Online**, [s. l.], v. 8, n. 10, p. 1711–1722, 1996.
- KOH, Serry et al. Arabidopsis thaliana subcellular responses to compatible *Erysiphe cichoracearum* infections. **Plant Journal**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 516–529, 2005.
- KRISHNAKUMAR, Vivek et al. Araport: the Arabidopsis Information Portal. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 43, n. D1, p. D1003–D1009, 2015. Disponível em: <<http://academic.oup.com/nar/article/43/D1/D1003/2439074/Araport-the-Arabidopsis-Information-Portal>>
- KUBICEK, Christian P.; STARR, Trevor L.; GLASS, N. Louise. Plant Cell Wall – Degrading Enzymes and Their Secretion in Plant-Pathogenic Fungi. [s. l.], 2014.
- KULCHESKI, Franceli R.; MARGIS, Rogério. Pequenos RNAs e aplicações de RNAi em plantas. In: RESENDE, Rodrigo Ribeiro (Ed.). **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4**. [s.l.] : Editora Blucher, 2017. p. 675–708.
- KULCHESKI, Franceli Rodrigues; MARCELINO-GUIMARAES, Francismar Correa; LIMA, Alexandre. The use of microRNAs as reference genes for quantitative PCR in soybean The use of microRNAs as reference genes for quantitative polymerase chain reaction in soybean. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 406, n. 2, p. 185–192, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2010.07.020>>
- KURIHARA, Y.; TAKASHI, Y.; WATANABE, Y. The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. **RNA**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 206–212, 2005.
- LAO, Kaiqin et al. Multiplexing RT-PCR for the detection of multiple miRNA species in small samples. [s. l.], v. 343, p. 85–89, 2006.
- LEBEDA, A. et al. The role of enzymes in plant-fungal pathogens interactions / Die Rolle der Enzyme in den Beziehungen zwischen Pflanzen und pilzlichen Erregern. **Journal of Plant Diseases and Protection**, [s. l.], v. 108, n. 1, p. 89–111, 2001.

- LEYVA-GONZÁLEZ, Marco Antonio et al. Functional and Transcriptome Analysis Reveals an Acclimatization Strategy for Abiotic Stress Tolerance Mediated by Arabidopsis NF-YA Family Members. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 10, p. e48138, 2012. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0048138>>
- LI, Chao; ZHANG, Baohong. MicroRNAs in Control of Plant Development. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 231, n. 2, p. 303–313, 2016.
- LI, Wen-Xue et al. The Arabidopsis NFYA5 Transcription Factor Is Regulated Transcriptionally and Posttranscriptionally to Promote Drought Resistance. **The Plant Cell**, [s. l.], v. 20, n. 8, p. 2238–2251, 2008. Disponível em: <<http://www.plantcell.org/lookup/doi/10.1105/tpc.108.059444>>
- LI, Yan et al. Osa-miR169 negatively regulates rice immunity against the blast fungus *magnaporthe oryzae*. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 8, n. January, p. 1–13, 2017.
- LIANG, B. Y. Kung-ye; ZEGER, Scott L. Longitudinal data analysis using generalized linear models. [s. l.], p. 13–22, 1986.
- LIANG, Gang; HE, Hua; YU, Diqiu. Identification of Nitrogen Starvation-Responsive MicroRNAs in Arabidopsis thaliana. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 11, p. e48951, 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0048951>>
- LLAVE, Cesar. Cleavage of Scarecrow-like mRNA Targets Directed by a Class of Arabidopsis miRNA. **Science**, [s. l.], v. 297, n. 5589, p. 2053–2056, 2002.
- LU, Cheng; FEDOROFF, Nina. A Mutation in the Arabidopsis HYL1 Gene Encoding a dsRNA Binding Protein Affects Responses to Abscisic Acid, Auxin, and Cytokinin. **The Plant Cell**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 2351–2365, 2000. Disponível em: <<http://www.plantcell.org/lookup/doi/10.1105/tpc.12.12.2351>>
- LUAN, Mingda et al. Expression of zma-miR169 miRNAs and their target ZmNF-YA genes in response to abiotic stress in maize leaves. **Gene**, [s. l.], v. 555, n. 2, p. 178–185, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.11.001>>
- MARTINEZ, Gilmara Carvalho et al. Seleção de isolados de Colletotrichum da biodiversidade da Amazônia como produtores de lacases utilizando uma metodologia simplificada. **Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 397–406, 2015.
- MEINKE, David W. Arabidopsis thaliana: A Model Plant for Genome Analysis. **Science**, [s. l.], v. 282, n. 5389, p. 662–682, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.282.5389.662>>
- MUSIDLAK, Oskar; NAWROT, Robert; GOŹDZICKA-JÓZEFIAK, Anna. Which plant proteins are involved in antiviral defense? Review on in vivo and in vitro activities of selected plant proteins against viruses. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 11, 2017.
- NAG, Anwasha; JACK, Thomas. Sculpting the Flower ; the Role of microRNAs in Flower Development. **Current Topics in Developmental Biology**, [s. l.], v. 91, n. 10, p. 349–378,

2010.

NAKAZAWA, Yukihiro et al. The dsRNA-binding protein DRB4 interacts with the Dicer-like protein DCL4 in vivo and functions in the trans-acting siRNA pathway. **Plant Molecular Biology**, [s. l.], v. 63, n. 6, p. 777–785, 2007.

NAVARRO, Lionel et al. A Plant miRNA Contributes to Antibacterial Resistance by Repressing Auxin Signaling. **Science**, [s. l.], v. 312, n. 5772, p. 436–439, 2006.

NAYA, Loreto et al. Regulation of Copper Homeostasis and Biotic Interactions by MicroRNA 398b in Common Bean. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. e84416, 2014. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0084416>>

NISHIMURA, Marc T.; DANGL, Jeffery L. Arabidopsis and the plant immune system. **Plant Journal**, [s. l.], v. 61, n. 6, p. 1053–1066, 2010.

NOWICKI, Marcin et al. Alternaria Black Spot of Crucifers: Symptoms, Importance of Disease, and Perspectives of Resistance Breeding. **Vegetable Crops Research Bulletin**, [s. l.], v. 76, n. 1, p. 525–541, 2012.

O'CONNELL, Richard et al. A Novel Arabidopsis-Colletotrichum Pathosystem for the Molecular Dissection of Plant-Fungal Interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 272–282, 2004.

O'CONNELL, Richard J. et al. Lifestyle transitions in plant pathogenic Colletotrichum fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 44, n. 9, p. 1060–1065, 2012.

OLIVER, Richard P.; SOLOMON, Peter S. Recent Fungal Diseases of Crop Plants : Is Lateral Gene Transfer a Common Theme ? **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 287–293, 2008.

PANDELOVA, Iovanna et al. Analysis of Transcriptome Changes Induced by Ptr ToxA in Wheat Provides Insights into the Mechanisms of Plant Susceptibility. **Molecular Plant**, [s. l.], v. 2, n. 5, p. 1067–1083, 2009.

PÉLISSIER, Thierry et al. Double-stranded RNA binding proteins DRB2 and DRB4 have an antagonistic impact on polymerase IV-dependent siRNA levels in Arabidopsis. **Rna**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 1502–1510, 2011.

PEREIRA, Ricardo Borges et al. **Manejo da pinta preta: uma ameaça às lavouras de tomateiro a céu aberto**. 2013. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/960748>>. Acesso em: 7 nov. 2018.

PERFECT, Sarah E. et al. Colletotrichum: A Model Genus for Studies on Pathology and Fungal-Plant Interactions. **Fungal Genetics and Biology**, [s. l.], v. 27, n. 2–3, p. 186–198, 1999.

POCHON, Stephanie et al. The Arabidopsis thaliana-Alternaria brassicicola pathosystem: A model interaction for investigating seed transmission of necrotrophic fungi. **Plant Methods**,

[s. l.], v. 8, n. 1, p. 1, 2012. Disponível em: <8/1746-4811-8-16>

RAHIMPOUR, Hamed et al. The microRNA pathway core genes are differentially expressed during the development of *Helicoverpa armigera* and contribute in the insect's development. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 110, n. March, p. 121–127, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.05.005>>

RAJA, P. et al. Arabidopsis Double-Stranded RNA Binding Protein DRB3 Participates in Methylation-Mediated Defense against Geminiviruses. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 88, n. 5, p. 2611–2622, 2014.

REIS, Rodrigo S. et al. Gene regulation by translational inhibition is determined by Dicer partnering proteins. **Nature Plants**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 1–6, 2015.

REIS, Rodrigo S.; EAMENS, Andrew L.; WATERHOUSE, Peter M. Missing Pieces in the Puzzle of Plant MicroRNAs. **Trends in Plant Science**, [s. l.], v. 20, n. 11, p. 721–728, 2015.

REMANNS, Tony et al. Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations. **Planta**, [s. l.], v. 227, n. 6, p. 1343–1349, 2008.

ROTEM, J. **The genus Alternaria: biology, epidemiology and pathogenicity**. 2nd editio ed. St. Paul: APS Press, 1998.

RUBIO-SOMOZA, Ignacio; WEIGEL, Detlef. MicroRNA networks and developmental plasticity in plants. **Trends in Plant Science**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 258–264, 2011.

RYTER, Jodi M. Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 17, n. 24, p. 7505–7513, 1998. Disponível em: <<http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/17.24.7505>>

SALVADOR-GUIRAO, Raquel et al. The MicroRNA miR773 Is Involved in the Arabidopsis Immune Response to Fungal Pathogens. [s. l.], v. 31, n. 2, p. 249–259, 2018.

SAMAD, Abdul Fatah A. et al. Analysis of miRNAs targeting transcription factors in *Persicaria minor* induced by *Fusarium oxysporum*. In: 2016, **Anais...** [s.l: s.n.] Disponível em: <<http://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.4966719>>

SCHWESSINGER, Benjamin; ZIPFEL, Cyril. News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 389–395, 2008.

SHARMA, Pratibha et al. Penetration and Infection Processes of *Alternaria brassicicola* on Cauliflower Leaf and *Alternaria brassicae* on Mustard Leaf: A Histopathological Study. **Plant Pathology Journal**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 100–111, 2014. Disponível em: <<http://www.scialert.net/abstract/?doi=ppj.2014.100.111>>

SHIMADA, Chiyumi et al. Nonhost resistance in *Arabidopsis*-*Colletotrichum* interactions acts at the cell periphery and requires actin filament function. **Molecular Plant-Microbe**

Interactions, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 270–279, 2006.

SHLEZINGER, Neta et al. Anti-apoptotic machinery protects the necrotrophic fungus botrytis cinerea from host-induced apoptotic-like cell death during plant infection. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 7, n. 8, 2011.

SIEBER, Patrick et al. Redundancy and specialization among plant microRNAs: role of the MIR164 family in developmental robustness. **Development**, [s. l.], v. 134, n. 6, p. 1051–1060, 2007. Disponível em: <<http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.02817>>

SONG, Xianwei et al. MicroRNAs and Their Regulatory Roles in Plant–Environment Interactions. **Annual Review of Plant Biology**, [s. l.], v. 70, n. 1, p. 489–525, 2019. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-arplant-050718-100334>>

SOTO-SUÁREZ, Mauricio et al. The Arabidopsis miR396 mediates pathogen-associated molecular pattern-triggered immune responses against fungal pathogens. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. March, p. 1–14, 2017.

SPOEL, S. H.; JOHNSON, J. S.; DONG, X. Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 104, n. 47, p. 18842–18847, 2007.

ST JOHNSTON, D. et al. A conserved double-stranded RNA-binding domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 89, n. 22, p. 10979–10983, 1992. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.89.22.10979>>

STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 18–46, 2011.

SZARZYNSKA, Bogna et al. Gene structures and processing of Arabidopsis thaliana HYL1-dependent pri-miRNAs. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 37, n. 9, p. 3083–3093, 2009.

TANG, Fuchou et al. MicroRNA expression profiling of single whole embryonic stem cells. **Nucleic acids research**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. e9, 2006. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gnj009>>

TANZ, Sandra K. et al. SUBA3: a database for integrating experimentation and prediction to define the SUBcellular location of proteins in Arabidopsis. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 41, n. D1, p. D1185–D1191, 2012. Disponível em: <<http://academic.oup.com/nar/article/41/D1/D1185/1063205/SUBA3-a-database-for-integrating-experimentation>>

THOMMA, Bart P. H. J. Alternaria spp.: From general saprophyte to specific parasite. **Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 225–236, 2003.

TIAN, Bin et al. The double-stranded-RNA-binding motif: interference and much more. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 5, n. 12, p. 1013–1023, 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrm1528>>

VANDESOMPELE, Jo et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data

by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, [s. l.], v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, 2002. Disponível em: <<https://www.jair.org/index.php/jair/article/view/10878>>

VAUCHERET, Hervé. Plant ARGONAUTES. **Trends in Plant Science**, [s. l.], v. 13, n. 7, p. 350–358, 2008.

VETUKURI, Ramesh R. et al. Evidence for Small RNAs Homologous to Effector-Encoding Genes and Transposable Elements in the Oomycete *Phytophthora infestans*. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 12, 2012.

VIDHYASEKARAN, P. **Fungal pathogenesis in plant crops: molecular biology and host defense mechanisms**. 2nd Editio ed. New York: CRC Press, 2008.

WAESE, Jamie et al. ePlant: Visualizing and exploring multiple levels of data for hypothesis generation in plant biology. **Plant Cell**, [s. l.], v. 29, n. 8, p. 1806–1821, 2017.

WU, Jiahe et al. The ghr-miR164 and GhNAC100 module participates in cotton plant defence against *Verticillium dahliae*. **bioRxiv**, [s. l.], p. 440826, 2018. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/440826v1>>

YAN, Yaqin et al. *Colletotrichum higginsianum* as a model for understanding host–pathogen interactions: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 1–18, 2018.

YU, Yu; JIA, Tianran; CHEN, Xuemei. The ‘how’ and ‘where’ of plant microRNAs. **New Phytologist**, [s. l.], v. 216, n. 4, p. 1002–1017, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/nph.14834>>

ZAMPOUNIS, Antonios et al. Genome Sequence and Annotation of *Colletotrichum higginsianum*, a Causal Agent of Crucifer Anthracnose Disease. **Genome Announcements**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. e00821-16, 2016.

ZHANG, Xian et al. Mini review: Revisiting mobile RNA silencing in plants. **Plant Science**, [s. l.], v. 278, n. October 2018, p. 113–117, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.10.025>>

ZHAO, Jia-ping et al. Involvement of microRNA-Mediated Gene Expression Regulation in the Pathological Development of Stem Canker Disease in *Populus trichocarpa*. [s. l.], v. 7, n. 9, 2012.

ZHU, Shifeng et al. Double-Stranded RNA-Binding Protein 4 Is Required for Resistance Signaling against Viral and Bacterial Pathogens. **Cell Reports**, [s. l.], v. 4, n. 6, p. 1168–1184, 2013.

APÊNDICE A – Sequências gênicas utilizadas para a projeção dos iniciadores .

As regiões gênicas estão representada pelas seguintes cores: Verde escuro/claro – região 5’ UTR; Azul escuro/claro - região CDS; Rosa escuro/claro – região 3’UTR

DRB1

>AT1G09700.1

ATATTAACATTTGTAACATAACAATTAAGAACCACCTTCTTTCGTTTGCCCTTGTGAAAAA
 AAACAAAAATAAAAATCAGTAAAGAGGAGGAAGTCGAGGGGAGAGGGTTTTTGGTGAAGAAG
 AATCATCTCTCTCTCTCTGCTTCTTCGCAGCAGCAGCACGTTTCTTTCTTGCTCTTCGCCGT
 GCCCTACTAACCTATTATTTCGTCTCTTCAGCTACATTCTGCTCGTGAAAATGACCTCCACTG
 ATGTTTCCTCTGGTGAATTACTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCCACCATCATGTCTGCATT
 ATCTCTAATTCAACATTCATGGGTTGTTTTTCCGGGTTTTAATTTTGAAACCAGATCATGC
 TTTTTCCCCTTCTTCTGTTCTTTACTCACTTCTTCTTCTTGGAAATTGGATTGCAGTGTT
 TTGATTAGTTAGAATTTACAAGTGTATCTGTCCCTTGTGGGTTTAAGCGTAGATCTCTCTGG
 CAATTGGCAAGTTTACTCTTTTGAGATGATGATTTATTGACTCAATTTGTTAGGGAACATAG
 AAGCTTGGTTTAAACTGTCTCTCCCCTTTGGATAAGTATAGTTTCTTTGTGAAAGTCGTC
 AGCTTTATTCAGAACTCGTTCACTGCTGTTCCCTGTTGTCGTTTTGAGTTTATTTGCAATTT
 ATGCTGTAGTGGATAGCATCATCACTGTTTTCTGTTTTATCTTTTGCCTCATTTTGAAGTTTT
 TTTCCCTGCTCAGGTGTTTCCAATTGCTATGTTTTCAAAGTCGGTTGCAGGAGTATGCTCAG
 AAGTACAAGCTCCCAACGCCTGTTTATGAGATCGTTAAAGAAGGCCCTTCACACAAATCTTT
 ATTTCAATCGACTGTGATACTGGATGGTGTGAGATATAATTCTTTGCCTGGATTCTTCAATC
 GTAAGGCTGCAGAGCAATCAGCTGCCGAGGTTGCTCTCCGGGAATTAGCAAAATCCAGTGAG
 CTAAGCCAATGTGTTTCAACAACCTGTTGTAAGCACCTCATCTTTCTTATTTGCTCGTGATT
 ATTGTTAAGTTCAGTCAAAACTATTGAACCTAGCCTAGGGGTTTAGCAGCGAATTGTAGCT
 TTGCCATCTCAGCAGTAGTCCTTATGCTTAGTTTGAAGGTTTAAAGGGAAGCTCA
 TGGTTAGTTTCAAGGTTTAAAGGGGAGCTGTGAGAATACGTTAGGGGGCATTCTG
 TATTTGTCTAGGCTCTTGGTTGGACAATGATCGAGATTCAAGAGTTTAAAGAATCCACTCAT
 TAATAAAGTGTCTTCTGTCTTATCGGATTTATGTGTATTGCCAACTTCTAGAGGGAAGATTC
 TTAGGCTGTTTCTGTAAGTTATTGCTCTTGTCTAACTTTGAATGGCTTATTAATGCAGCACG
 AAACGGGATTATGCAAGAACCTACTTCAAGAATACGCTCAAAGATGAATTACGCGATTCCA
 TTGTATCAGTGCCAGAAGGTCGAAACTCTTGGGAGAGTTACACAATTCACATGTACTGTAGA
 GATTGGAGGCATAAAGTACACAGGAGCTGCAACAAGAACTAAAAAGATGCTGAGATTAGCG

CTGGGAGAACTGCTCTTTTAGCGATCCAGTCAGACACTAAAAACAACCTTGCCAACTACAAC
 ACTCAGCTTACTGTACTTCCTTGTGAGAAGAAGACAATACAGGCAGCTATCCCGCTTAAAGA
 AACCGTCAAGACTCTTAAAGCCAGGAAGGCTCAGTTCAAGAAGAAAGCTCAGAAAGGAAAAC
 GCACAGTAGCTAAAAATCCTGAAGATATTATCATCCCTCCTCAACCTACTGATCATTGTCAA
 AACGATCAGTCAGAGAAAATTGAGACAACGCCAAATCTGGAACCTTCTTCATGCATGAACGG
 GTTAAAGGAGGCAGCATTGGGGAGTGTGGAGACAGAGAAAATTGAGACAACGCCAAATCTGG
 AACCTCCTTCATGCATGAACGGGTAAAGGAGGCAGCATTGGGGAGTGTGGAGACAGAGAAA
 ATTGAGACAACGCCAAATCTGGAACCTCCTTCATGCATGAACGGGTAAAGGAGGCAGCATT
 TGGGAGTGTGGAGACAGAGAAAATTGAGACAACGCCAAATCTGGAACCTTCTTCATGCATGA
 ACGGGTAAAGGAGGCAGCATTGGGGAGTGTGGAGACAGAGAAAATTGAGACAACGCCAAAT
 CTGGAACCTCCTTCATGCATGAACGGGTAAAGGAGGCAGCATTGGGGAGTGTGGAGACAGA
 GAAAATTGAGACAACGCCAAATCTGGAATCTTCTTCATGCATGAGCGGGTAAAGGAGGCAG
 CATTGGGGAGTGTGGAGACAGAAGCAAGCCACGCATAACAGTGTCAAGATGGAGTCTTGTGA
 GTTTGTCATAGTTACTATATGGTTACGTAGCCATTTTGTGATTCCCTATCTAGTCTAGTAGTA
 ATTCACAGATTGAAGAGAAGTAATATTTGAGCGGAAAATCAAACCTAATATGATTGGTACAA
 TTTGGTGGTTCGATTGAGTCATTCGAATAAAGTAATGTGGGGTTGC

DRB2

>AT2G28380.1

CACTCTCTCTCTCTCTTGCTCCTCCCTCTCTTCCTCTCTCTATCTCTCTCTGCAAAAACCCT
 AAATTTCCCTCCGATTTCAACCATCTTCAATCTCCTTCACACCCCAACTTAGCCTCTTAATCAC
 TCCCAAGCTAAACCCTCCAACGATTTTCCATGATTCGAAGATACAGAGCCTTAGCGATGAA
 GAAAAGCCCTAAAAACCAAAGCTTTGATCTCTCCGAAATCGGAGTTTCTTTCTTTGTTGG
 TAAATTTGGTTTTTCGAAATGTATAAGAACCAGCTACAAGAGTTGGCTCAGAGGAGCTGCTTT
 AATCTTCCTTCGTATACTTGTATTAGGGAAGGTCCTGACCACGCGCCGCGATTCAAGGCTAC
 TGTTAACTTTAACGGCGAGATCTTTGAGAGTCCTCAGTATTGTTCTACTCTTCGTCAGCTG
 AACACTCTGCTGCTGAAGTTGCTCTCAATGCTCTCTCTAATCGTGGTCCTTCTCACTCTCTT
 GCCGCCAGGATCTTGTTTGTTCGCTTCCTCTTACTCTCTTTGGCATTCTTACTTGAAAAT
 TGTGAGCTTTGAATGCTGAATTTGCATGTTGTTTTAGGTGCTTTAGGTCACTGATGGGTTTA
 GTTTGTGGTTAGGTTTTTACTTATTAGGGTCGGTGCTGAGATCTCTGACTTGCTTTTTAGGG
 ATTTGGGTTTCTGGGTTGTCTGATTAGAGAGAGTGATCTTCACATTCACTGATCTATGGATC
 CAAAGTTTGAATCTTGTCTTACCCATTGATTGGTTTGGGACTTAAATGAGTAGAACAAATA
 ACTTTTGTGATTTTGGATGCATGTTTACTTCTGATGTTTTGCTTGTTCATGACTGATGATA

CTTTTCTTGGCTCTGTTCTTTTGGATTATGGTTTGTGTAGGATGAGACGGGTGTGTATAAGA
 ATCTTTTGCAAGAGATAGCTCAAAGAGTGGGAGCTCCTTTACCGGATATACTACTTTTCAGG
 TCAGGTCTTGGTCACCAACCTGTGTTTACTGGTACTGTAGAATTGGCTGGAATTACGTTTAC
 TGGAGATCCAGCTAAGAACAAGAAGCAAGCAGAGAAGAATGCTGCAATGGCTGCTTGGTCTT
 CCCTAAAACAATGTGAGTCCTAATTCTGATTTTGTGAGTTTTGATATGGTTTTAGTTTAACG
 CAGGCGTTGATCAAATGTAACCTCTGCTTACATGGTTTGATGTTTTTTATGTTCTTCTTGGTA
 ACAGTGGCAAAGAAACATCAAGTTCAATGCCTGAGCCTGAGAACATTGACGAACTAGAACA
 GGTGATTATAGCAAGAGCTTTGATAAACTATCGTATCAAGGAAAACATTGGCACAGGAAGCT
 CCTCGAGTGCCCCAGTTCATTTGCAAAGAAGTTCTTTATGCAGAACCTTAGACCAACAAGT
 CCACAGCCTTCTCCTGCAACCACATCGAGAATCTTACCCTTTATTTGCCAAAACAACCTTC
 CAGAAGCAGCAGATCATCCTTAGCAGCAACTTCCGGTATTGACAGAATTATGGCAGCAGCCT
 TGGAAAGCCGCAGCTACCAGCGGCCTCAGCAGAGATTTGCAAATCCGCCTTATGTTCCCTATG
 AGGCAATTTAGATCGCAATGCCATGGGATGGCTCCACCTGTCACAATCAGAACCGCTGTACC
 GGTCTTCTCTGCACCTCCAATGCCTCCTCCACCATGTACAAACAACACTCAGCTACCTTCTT
 CTGTGTATGTCCATCGCTGATGCGAACTGCACCACCTGTGAGGATCGCGCCGCCTGTCACA
 ATCAGAACCGCGGTGCCGTATTTGCTTCTGCGCCACCGGTTAGAATTAGAACCGCTGTGAA
 GCCCACAGTTGAGGCAGGAGAAACCCGCATATCATCAGTCCAAGAAAAGGAGAGTATACCAG
 TCTTGCCTGATAGTCTTGAAATTGGAGTAGAAGGAAGTACTATAACAATTACAGATTGTGAG
 AAAACAGCGTCAAAGGAAACCGAGAGAGCAGAGTTTAAGGATTCATCGAAAGGAGAACCGGA
 GACAGCAAGAGAGCGACTGGAGAACCTAAAGATCTGATGCCTTGAAGACTGTCTCTGGGTTT
 AGTTTTTTTTGAGGTTGGTTTCTGAAAATTGTTACATTAGTAATCTCGTTCGTTATTATACT
 CGGTGGATCGAGTAGTTTGATAATCCGAAAGATTTGTATTATATTGGGGAGTTTTGGGAAGA
 ACCTGGCCATCTCTGGATTGTAGAATTGTATCAGTTTCGCTTCTTATTAGTTTGTGTGT
 CCTTTTTCTCATCTTTTATAAATCTGTTACCTATCGTTGTTCCAGCAGAATCAAGCTCTTTG
 TCTTACACGACAGC

DRB3

>AT3G26932.1

ATCTTTCTGTCTTCTAAATTCACCTTCAACATCAGAGAGCCCTAAGCTTTTTTTTTTACTCA
 TTACACCAAAAACCTTCAACGGCAATTTAACCAAGTGAGTTTCTTGTAGTTTTGCTACTTCT
 CTCTCTTCTTGAACACTGTAGAGTCTTAAGGTCCATATCACATGATGGAGACAAGCTCCTC
 TGTTTATATATTAAGAGACACCAAATCTTAAATACCAATTTAAGCAGGTGGGTTTCCTTTGT
 CTTCTCTTTAAACCCTCAACAGCTTTTCAGTTTTAGGATAAAGTTGGAGTTTCAAATTCCTGC
 TGCCTTACTCTTTTCCTCAATCTCTCTGCTTTTTGTACATACCAAAAGATGTATAAGAAT

CAGTTGCAAGAGCTTGCACAGAGGAGTTGTTTCAGTCTCCCATCATATACATGCACAAGAGA
 AGGACCAGATCATGCTCCAAGATTCAAAGCTAGTGTAACCTTCAATGGTGAGATATTTGAAA
 GCCCAACTTACTGTTCTACTCTCAGACAAGCTGAGCATTGAGCTGCTGAAGTTGCTCTTAGT
 GCTCTCTCTTCCAAAGGTCTTCAAAGTCTCTAAGTCTAGAGTTCTAGTAAGTCTTAATCT
 CCTCTAAAGCATGCAAAGTTCTTTCTCATGTTTGAATCATTTTTTTTTTTCGGAAGTCTAATAA
 TGTTTGGTTGTTTCTCTGAGGATGAGACTGGGATCTACAAGAATCTGCTTCAAGAGACAGCA
 CACAGAGCTGGTCTTGATCTACCGGTTTACACAAGTGTGAGATCAGGACCTGGTCACATCCC
 AACATTCTCTTGTACTGTGGAGCTTGCTGGAATGAGTTTTAATGGAGAATCAGCAAAGACTA
 AGAAACAAGCTGAGAAGAATGCAGCCATTGCAGCTTGGTTCTCCTTGAGAAAAAGTACCTCC
 AACTCCAAACTTTTTACTCAAATCTTATTGGTTTGTATCTCTCTCATTCACCCTTTGCTA
 CATAACAGTGCCAAGATTGGACCCATTGAGAGGTGAAGAGAAGGAACAAGAGATAGTTGCA
 AGAGTCCTCTCAAGATTTAGACCCAAAGAAGTGAAAAGAAGAGAACCAAACCAGTCAAGAAG
 AAGAACAGTCATCAGAACAATTCGCCAAAACACAACAACAACAACAACCACAGGAGACT
 TGTTGTGTGAGAAACTCAGATCCATCAATCTATATACCAATGAAGCTTCATCATCATCACC
 CCACCACAGAGATTCTGGCCTTCAAGAACAATCTCACACAAGAACAATCCAAAGTCAAATC
 ATTGCTAGAGAAATGTCAAGAATATGCAGAGAAGAAACAGAGCCTAGATGATCCTAAGCCAG
 AGATGAGAATCAAACATCATCACCATCACCATTATCATCATCAGTGGAGAGAACTGTTAT
 AGTAAGTCTTACCCTTTCCAAGTTTTGTGTTAAACCATCAGAACTAGCTCCAGCAGTTCA
 CATCAGATCAGTGATCCCAGTTTGTTCAGCTCCTCCACCAAACCTAACCTAACCTAATT
 CATCACCGTTCATCACAAGGGAGCTGGGAAATGGAAGCCAAGAGAAGAAGTCATTACCAAAT
 TAGGATTAGAAACAAAATCTGGATCAAACCCATGATTAAAGGTTGTGTCTTTAGATAAACCC
 ATGTTAAGGATTTGATAATAGAGAGATTAGAGAAATGGGTAAAATCAAATCAGGTCATGGGT
 TTCTGTATGTTTCGTCTGTAAATTTGACTTTTTTTGAATTTTACGACCTGACATGAAATCAAT
 GTTTCTG

DRB4

>AT3G62800.1

CAATCAGCGAATGCTTTGTCTGATTGTTCACTTCCTCCCTCGAAGTGTCTTCACCATTTCAA
 AGAGGTACGATTTTGTGTTTATAATCGTAGATTCCTTTCGCTGTTTTGATGTTATCGATCTG
 TACGAAACCCTAGATCATTGAGTCTGACCAATTCTGAAATTCGTCTCTTCGTTTGCCATTTA
 TGTTTGAGAAATCTGATACATGTTGTCATGTTGATCTCTTTATGTTTGGTTGACCAATTCT
 GAAATCTGAAATTCGTCTCTTCGTTTGCCATTTATGTTTGGAGAAATCTGATACACGTTGAT
 CTCTTTATGTTTGGTTAATTCCTGCCAGTTTAGATAGAGATGGATCATGTATACAAAGGTCA

ACTGCAAGCGTATGCCCTGCAACATAATCTGGAGCTACCAGTGTATGCGAATGAGAGAGAAG
 GGCCCTCCTCATGCTCCTAGATTTAGATGTAATGTTACATTCTGTGGACAGACTTTCAGAGC
 TCTGAATTCTTCCGACACTAAAATCGGCTGAACATGCCGCTGCAAAAATTGCAGTTGCTTC
 TTTGACGCCACAAAGTCCAGAGGCTAGTTCCTCACACTCTTTTTGGACTACAAGTTATGTGC
 TTTTTCAACATTTGTTTAAATTTTGATTTTCAAATTTTTGTTGTTTCAGGGAATTGATGTTG
 CCTACAAGAACCTGTTACAAGAAATTGCACAGAAAGAGAGTTCTCTGTTACCATTTTATGCA
 ACTGCTACATCTGGTCCATCGCATGCGCCTACTTTTACTTCAACTGTTGAGTTTGCTGGTAA
 AGTTTTTCAGTGGAGAAGAGGGCGAAAACCAAAAAGTTGGCTGAAATGAGCGCTGCTAAAGTTG
 CATTTCATGAGTATCAAAAATGGGAATCGAACCAGACCGGATCGCCTACTTTGCCTAGTGAG
 AGACAAGAAGATGTAAATTCAAATGTGAAGAGCAGTCCACAAGAGATCCATTCTCAACCTTC
 TTCCAAGGTGGTGTATGACCCCTGATACCCCATCAAAGGGGATTAAAGTGAATGAAGATGTT
 AGTTTTCTTTGAATACTACACTACATGAATAATCCGTTGGTTTGTGTTAAAGGAAAAACT
 CTCTTTCTTTGTTATAACTTGTGGTCCAATCAGAGGGACGTATTTTCTGAGATAGGTAGGA
 AACAGCTATGAAATAAGAAAGCCAACCTTACTTTAACTGCATGAAATGGATTCCAATTTAG
 TTTAATGCTAAATGGTCAAGATGGTAAATTCATTCAAACCTCATGCTCTACAGTCTTGATTC
 TGTGCAGAAATTTCCAGATCTTCATGATGCACCAGCCAGTAATGCTAAGGAGATTAACGTTGC
 TTTGAATGAGCCTGAGAATCCTACAAACGATGGTACTCTTAGTGCACCTAACTACTGATGGTA
 TGAAGATGAACATTGCTTCTTCTTCTTTGCCTATACTCACAATCCTACAAACGTTATTACT
 CTTAATGCACCAGCTGCCAATGGTATCAAGAGGAACATTGCTGCTTGTCTTTCGTGGATGCC
 TCAGAATCCCACAAACGATGGTAGTGAAACATCATCATGTGTAGTAGATGAGAGTGAGAAAA
 AGAAGCTCATAATGGGAATGGCCACCTGAGTATAACCAACTGGCCAACATGTAGTTTGTGCG
 CCATGGAACCCCGAGATAACTCTTCTCAAGACGCGGAGATGCTCTTTAGAGATGATAAATT
 TATAGCCTATCGTCTTGTGAAGCCATAACGACATCATCATCTTTGATGCATAATAAGTGTAG
 AGATAGAATGTTAAGGTAAGCTATATCTCATCTGTTTGTAGAAATAGAATGCTTCTCGTCTC
 TGGTTTTCTTAAGCAATATGCTATGTAGTATGTATACTGTGTAATGACTAATTTTTGTTTT

DRB5

>AT5G41070.1

ATTTAGAACCTTTAGTACCTTACCATGTGAGTGAAGAGTTCAAAAACCTCTGCAAAAACCTT
 CTTTTTTATCTCTCTCTCTTCTTTAACTTACTTTCAAACACTAAATAGCCAAAACCTTAAGA
 TACCAAATTTCAACAGGTCGGCTTTTTCGTTTGTCTTCTTAAAGACTTTACCAAAGAGAT
 TTGTGGTTTTCTGGAGTTGACTTTGGTTGATTTTGGTGTATTTACAGGGGAAAAAATGTATAA
 GAATCAGCTTCAAGAGCTTGCACAGAGAAGTTGTTTCAACTTACCATCATATACTTGCATAA
 GAGAAGGACCAGATCATGCTCCAAGATTCAAAGCTTCTGTAACTTCAATGGTGAGATATTT

GAGAGTCCCACTTACTGTTCTACTCTCAGACAAGCTGAGCATGCAGCTGCTGAAGTTTCCT
 TAATGTCCTTTCGTCTAGAGTCCCTTCAAAGTCTCTAACTGCTAAGATTCTTGTAAGTTCTC
 TGTCTTTTCTTCTTGGTTTTGATCATAACAAAAAATGCAAAAAGAGTAACATCGTATATC
 TTCATGTCACTCTTTATACAAGGATGAGACAGGGATTTACAAGAACCTGCTTCAAGAGACAG
 CACATAGAGCTGGTCTTGATCTACCAATGTACACAAGTGTGAGATCAGGATCTTGTCACTTC
 CCAGGTTTCTCTTGTACTGTTGAACTTGCTGGGATGACGTTTACAGGAGAATCAGCAAAGAC
 AAAGAAACAAGCTGAGAAAACGCAGCCATTGCAGCTTGGTCTCTTTGAAGAAAAGTATAT
 ATA ACTATCTTCAAATTGTTCCATCAACCCCAAAAAAGCTTCTCACTTTTCTACTTGAAAC
 CATTTTTCTGTTTCTCTACTGTGCAGTGTCAAGCTTGGATTCACAAGATGAAGAGAAGGAAC
 AAGAAGCAGTAGCAAGAGTACTCTCAAGATTTAAACCCAAAGAAGTAAGAAGACGAGAGACA
 ACAAACCAATGGAGAAGAAGAACAAGTCAACAAGATTCAAACAAGGATTTGTTGATTGAGAG
 ATTGAGATGGATCAATCTTTTGACCAATCAAGCTTCTTCATCATCATCAACATCAACACCGA
 ATCAACACAAAACTCCAGTTTCATCTCTCTAATTCCCCACCACCACCACCTAAATCCTCC
 AAAATTTTGCCATTTATCCAGCAATACAAAGACAGATCATCACAAGAAGCTAAGACAGAGAC
 AGCGACAGAGATGATCAACAGCAAAGCCAAAGTCAATGAAACATCAACCAGATTGAGTAAGC
 AAATGCCCTTTTCCGACATGAACAGATACAACTTTGTCCGGAGGGTGTAGCGTAAACCCTTAT
 AGTCTGGCTCCAGCGGTTCAAATGAGATCAGTGATTCCAGTTTTTCGCAGCTCCACCACCGAA
 ACCAAACCCCAACCTTAACCCATCATCATTATCATCATCAGTCAATGAATTCACCTCATCCA
 ATAATTCCTGCTCTGTTCTGAATACGCCGGGATTGGGAGGCCAAGAGAAGAAGAATCTAACT
 CGCGAAATGATCAAACCTTGGTTCAGAATCGAGAATTTTGGATCAAACCCATGATAGTTAGCT
 AAATTTGGTTAATGGGTTAATCTCAAATTAATCCTTGTCAAGTGTGTTGTCACATAGATAAA
 TTATAGACCAGTATGTTTCCGTTTCTTGAATGTGTTCTTGTGTTTTTTTTGAAGTGTGTTGAATT
 TTCT

ACT2

>AT3G18780.2

GAAAGGCCGAAAATAAAGTTGTAAGAGATAAACCCGCTATATAAATTCATATATTTTCCTC
 TCCGCTTTGAATTGTCTCGTTGTCTCCTCACTTTCATCAGCCGTTTTGAATCTCCGGCGAC
 TTGACAGAGAAGAACAAGGAAGAAGACTAAGAGAGAAAGTAAGAGATAATCCAGGAGATTCA
 TTCTCCGTTTTGAATCTTCTCAATCTCATCTTCTTCCGCTCTTCTTTCCAAGGTAATAGG
 AACTTTCTGGATCTACTTTATTTGCTGGATCTCGATCTTGTGTTTCTCAATTTCTTGGATC
 TGGAATTCGTTTAATTTGGATCTGTGAACCTCCACTAAATCTTTTGGTTTTACTAGAATCGA
 TCTAAGTTGACCGATCAGTTAGCTCGATTATAGCTACCAGAATTTGGCTTGACCTTGATGGA

GAGATCCATGTTTCATGTTACCTGGGAAATGATTTGTATATGTGAATTGAAATCTGAACTGTT
 GAAGTTAGATTGAATCTGAACACTGTCAATGTTAGATTGAATCTGAACACTGTTTAAGGTTA
 GATGAAGTTTGTGTATAGATTCTTCGAAACTTTAGGATTTGTAGTGTTCGTACGTTGAACAGA
 AAGCTATTTCTGATTCAATCAGGGTTTATTTGACTGTATTGAACTCTTTTTGTGTGTTTGCA
 GCTCATAAAAAATGGCTGAGGCTGATGATATTTCAACCAATCGTGTGTGACAATGGTACCGGT
 ATGGTGAAGGCTGGATTTGCAGGAGATGATGCTCCCAGGGCTGTTTTTCCCAGTGTGTTGG
 TAGGCCAAGACATCATGGTGTGATGGTTGGGATGAACCAGAAGGATGCATATGTTGGTGATG
 AAGACAATCCAAGAGAGGTATTCTTACCTTGAAGTATCCTATTGAGCATGGTGTGTTAGC
 AACTGGGATGATATGGAAAAGATCTGGCATCACACTTTCTACAATGAGCTTCGTATTGCTCC
 TGAAGAGCACCTGTTCTTCTTACCGAGGCTCCTCTTAACCCAAAGGCCAACAGAGAGAAGA
 TGACTCAAATCATGTTTGAGACCTTTAACTCTCCCGCTATGTATGTCGCCATCCAAGCTGTT
 CTCTCCTTGTACGCCAGTGGTCGTACAACCGGTTAGTACATTTTAGGCTTTTTGTATTACT
 CATTGATCATTATTTGAACTGAGCTCTGATTATCTTCCATTGAACAGGTATTGTGCTGGATT
 CTGGTGATGGTGTGTCTCACACTGTGCCAATCTACGAGGGTTTCTCTCTTCCCTCATGCCATC
 CTCCGTCTTGACCTTGCTGGACGTGACCTTACTGATTACCTCATGAAGATCCTTACAGAGAG
 AGGTTACATGTTACCACAACAGCAGAGCGGGAAATTGTAAGAGACATCAAGGAGAAGCTCT
 CCTTTGTTGCTGTTGACTACGAGCAGGAGATGGAAACCTCAAAGACCAGCTCTTCCATCGAG
 AAGAACTATGAATTACCCGATGGGCAAGTCATCACGATTGGTGCTGAGAGATTGAGATGCC
 AGAAGTCTTGTTCCAGCCCTCGTTTTGTGGGAATGGAAGCTGCTGGAATCCACGAGACAACCT
 ATAACTCAATCATGAAGTGTGATGTGGATATCAGGAAGGATCTGTACGGTAACATTGTGCTC
 AGTGGTGGAACCACTATGTTCTCAGGTATCGCTGACCGTATGAGCAAAGAAATCACAGCACT
 TGCACCAAGCAGCATGAAGATTAAGTTCGTTGCACCACCTGAAAGGAAGTACAGTGTCTGGA
 TCGGTGGTTCCATTCTTGCTTCCCTCAGCACATTCCAGCAGGTAAAAATTGATCAGATTTTG
 TTTTGAATTCTTTACATGCAAATTGAAATCAAAGGCTGATTATTTATGTATATGTTGGTTA
 CAGATGTGGATCTCCAAGGCCGAGTATGATGAGGCAGGTCCAGGAATCGTTCACAGAAAATG
 TTTCTAAGCTCTCAAGATCAAAGGCTTAAAAAGCTGGGGTTTTATGAATGGGATCAAAGTTT
 CTTTTTTCTTTTATATTTGCTTCTCCATTTGTTTGTTCATTTCCCTTTTTGTTTTCGTTT
 CTATGATGCACTTGTGTGTGACAACTCTCTGGGTTTTTACTTACGTCTGCGTTTTCAAAAA
 AAAAACCGCTTTCGTTTTGCGTTTTAGTCCATTGTTTTGTAGCTCTGAGTGATCGAATTGA
 TGCTCTTTATTCCTTTTGTTCCTATAATTTCTTTCAAACTCAGAAGAAAACCTTGAAA
 CTCTTTGCAATGTTAATAATAAGTATTGTATAAGATTTTTATTGATTTGGTTATTAGTCTTAC
 TTTTGCT

UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA

Sequência precursora (pre-miRNA)

>ath-MIR159a MI0000189

GUAGAGCUCCUUAAGUUCAAACAUGAGUUGAGCAGGGUAAAGAAAAGCUGCUAAGCUAUGG
 AUCCCAUAAGCCCUAUCCUUGUAAAAGUAAAAAAGGAUUUGGUUAUAUGGAUUGCAUAUCUC
 AGGAGCUUUAACUUGCCCUUUAUGGCUUUUACUCUUCUUGGAUUGAAGGGAGCUCUAC

MIR164

Sequência madura (miRNA)

>ath-miR164a MIMAT0000185

UGGAGAAGCAGGGCACGUGCA

Sequência precursora (pre-miRNA)

>ath-miR164a MI0000197

GGGUGAGAAUCUCCAUGUUGGAGAAGCAGGGCACGUGCAAACCAACAACACGAAAUCCGUC
 UCAUUUGCUUAUUUGCACGUACUUAACUUCUCCAACAUGAGCUCUUCACCC

MIR169

Sequência madura (miRNA)

>ath-miR169b-5p MIMAT0000906

CAGCCAAGGAUGACUUGCCGG

Sequência precursora (pre-miRNA)

>ath-miR169b-5p MI0000976

CCCAACGGAGUAGAAUUGCAUGAAGUGGAGUAGAGUAUAAUGCAGCCAAGGAUGACUUGCCG
 GAACGUUGUUAACCAUGCAUAUGAAUAAUGUGAUGAUUAAUUAUGUGAUGAACAUUUUCUG
 GCAAGUUGUCCUUCGGCUACAUUUUGCUCUCUUCUUCUCAUGCAAACUUCCUUGGG

MIR172

Sequência madura (miRNA)

>ath-miR172a MIMAT0000203

AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAU

Sequência precursora (pre-miRNA)

>ath-miR172a MI0000215

UGCUGUGGCAUCAUCAAGAUUCACAUCUGUUGAUGGACGGUGGUGAUUCACUCUCCACAAAG
UUCUCUAUGAAAUGAGAAUCUUGAUGAUGCUGCAUCGGC

MIR396**Sequência madura (miRNA)**

>ath-miR396a-5p MIMAT0000944

UUCCACAGCUUUCUUGAACUG

Sequência precursora (pre-miRNA)

>ath-MIR396a MI0001013

CUCUGUAUUCUCCACAGCUUUCUUGAACUGCAAACUUCUUCAGAUUUUUUUUUUUUUUCUU
UUGAUAUCUCUUACGCAUAAAAUAGUGAUUUUCUUCAUAUCUCUGCUCGAUUGAUUUUGCGGU
UCAAUAAAGCUGUGGGAAGAUACAGAC

APÊNDICE B – Expressão relativa dos genes *DRB1*, *DRB2*, *DRB3*, *DRB4*, *DRB5*, *MIR164*, *MIR169* e *MIR172* em *A. thaliana* durante infecção por *A. brassicicola*.

<i>Gene</i>	<i>Grupo</i>	<i>Tempo</i>				<i>Media Grupo</i>
		6h	12h	24h	48h	
<i>DRB1</i>	Controle	1,04 (0,05) ^{aA}	1,22 (0,20) ^{aA}	1,24 (0,19) ^{aA}	1,39 (0,19) ^{aA}	1,22 (0,08) ^a
	Infectado	1,66 (0,19) ^{bA}	1,31 (0,12) ^{aAB}	0,93 (0,08) ^{aB}	1,22 (0,24) ^{aAB}	1,28 (0,08) ^a
	Media Tempo	1,35 (0,10) ^A	1,26 (0,12) ^A	1,08 (0,11) ^A	1,31 (0,15) ^A	
<i>DRB2</i>	Controle	1,08 (0,08) ^{aA}	1,58 (0,25) ^{aA}	1,10 (0,18) ^{aA}	1,35 (0,16) ^{aA}	1,28 (0,09) ^a
	Infectado	1,40 (0,16) ^{aA}	1,29 (0,14) ^{aA}	0,82 (0,07) ^{aB}	1,25 (0,26) ^{aAB}	1,19 (0,09) ^a
	Media Tempo	1,24 (0,09) ^{AB}	1,44 (0,14) ^A	0,96 (0,10) ^B	1,30 (0,15) ^{AB}	
<i>DRB3</i>	Controle	1,03 (0,05) ^{aA}	2,59 (0,20) ^{aB}	0,51 (0,11) ^{aC}	0,58 (0,12) ^{aC}	1,18 (0,06) ^a
	Infectado	1,94 (0,34) ^{bA}	6,04 (0,35) ^{bB}	0,89 (0,09) ^{bC}	1,37 (0,28) ^{bAC}	2,56 (0,14) ^b
	Media Tempo	1,48 (0,17) ^A	4,32 (0,20) ^B	0,70 (0,07) ^C	0,97 (0,15) ^{AC}	
<i>DRB4</i>	Controle	0,96 (0,04) ^{aA}	0,99 (0,20) ^{aA}	1,66 (0,27) ^{aA}	1,48 (0,36) ^{aA}	1,27 (0,12) ^a
	Infectado	0,85 (0,09) ^{aA}	1,37 (0,24) ^{aA}	0,79 (0,11) ^{bA}	0,68 (0,14) ^{bA}	0,92 (0,08) ^b
	Media Tempo	0,90 (0,05) ^A	1,18 (0,16) ^A	1,23 (0,15) ^A	1,08 (0,19) ^A	
<i>DRB5</i>	Controle	1,00 (0,15) ^{aA}	0,89 (0,13) ^{aA}	0,11 (0,02) ^{aB}	0,07 (0,01) ^{aB}	0,52 (0,05) ^a
	Infectado	1,29 (0,28) ^{aA}	0,28 (0,02) ^{bB}	0,23 (0,06) ^{aBC}	0,11 (0,02) ^{aC}	0,48 (0,07) ^a
	Media Tempo	1,14 (0,16) ^A	0,59 (0,07) ^B	0,17 (0,03) ^C	0,09 (0,01) ^C	
<i>MIR164</i>	Controle	0,98 (0,08) ^{aA}	0,60 (0,04) ^{aB}	0,38 (0,06) ^{aC}	0,35 (0,04) ^{aC}	0,58 (0,03) ^a
	Infectado	1,02 (0,09) ^{aA}	0,80 (0,12) ^{aA}	0,30 (0,02) ^{aB}	0,29 (0,05) ^{aB}	0,61 (0,04) ^a
	Media Tempo	1,00 (0,06) ^A	0,70 (0,06) ^B	0,34 (0,03) ^C	0,32 (0,03) ^C	
<i>MIR169</i>	Controle	1,00 (0,04) ^{aA}	1,72 (0,23) ^{aB}	1,56 (0,08) ^{aB}	2,00 (0,21) ^{aB}	1,57 (0,08) ^a
	Infectado	2,28 (0,28) ^{bA}	1,84 (0,30) ^{aA}	1,95 (0,24) ^{aA}	1,87 (0,17) ^{aA}	1,98 (0,13) ^b
	Media Tempo	1,64 (0,14) ^A	1,78 (0,19) ^A	1,76 (0,13) ^A	1,93 (0,14) ^A	
<i>MIR172</i>	Controle	0,97 (0,02) ^{aA}	0,80 (0,03) ^{aB}	0,83 (0,06) ^{aAB}	0,74 (0,10) ^{aAB}	0,84 (0,03) ^a
	Infectado	0,80 (0,05) ^{bAB}	0,68 (0,03) ^{bA}	0,90 (0,02) ^{aB}	0,83 (0,09) ^{aAB}	0,80 (0,03) ^a
	Media Tempo	0,89 (0,03) ^A	0,74 (0,02) ^B	0,87 (0,03) ^A	0,78 (0,07) ^{AB}	

Valores médios e respectivos desvios-padrão (entre parênteses). Análises realizadas através do método de Equações de Estimativas Generalizadas (GEE). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ao nível de $p < 0,05$. Letras minúsculas distintas mostram diferenças na expressão gênica entre o grupo controle e infectado por *A. brassicicola* em cada tempo analisado. Letras maiúsculas distintas indicam variações da expressão gênica dentro de cada grupo (controle e infectado) em relação aos tempos analisados.

APÊNDICE C – Expressão relativa dos genes *DRB1*, *DRB2*, *DRB3*, *DRB4* e *DRB5* em *A. thaliana* durante infecção por *C. higginsianum*

Gene	Grupo	Tempo				Media Grupo
		6h	12h	24h	48h	
<i>DRB1</i>	Controle	1,01 (0,06) ^{aA}	1,04 (0,11) ^{aA}	1,1 (0,15) ^{aA}	1,28 (0,14) ^{aA}	1,11 (0,05) ^a
	Infectado	0,91 (0,20) ^{aAB}	1,06 (0,08) ^{aA}	1,55 (0,20) ^{aAB}	1,34 (0,05) ^{aB}	1,21 (0,07) ^a
	Media Tempo	0,96 (0,11) ^A	1,05 (0,07) ^A	1,33 (0,12) ^{AB}	1,31 (0,07) ^B	
<i>DRB2</i>	Controle	0,99 (0,03) ^{aA}	0,82 (0,09) ^{aAB}	1,07 (0,13) ^{aAB}	0,73 (0,07) ^{aB}	0,90 (0,04) ^a
	Infectado	1,22 (0,23) ^{aA}	0,95 (0,08) ^{aA}	1,13 (0,12) ^{aA}	0,91 (0,04) ^{ba}	1,05 (0,07) ^a
	Media Tempo	1,11 (0,12) ^{AB}	0,89 (0,06) ^{AB}	1,10 (0,09) ^A	0,82 (0,04) ^B	
<i>DRB3</i>	Controle	1,37 (0,24) ^{aA}	1,85 (0,47) ^{aA}	1,60 (0,11) ^{aA}	1,94 (0,35) ^{aA}	1,69 (0,16) ^a
	Infectado	1,21 (0,20) ^{aA}	0,46 (0,03) ^{bb}	3,67 (0,66) ^{bc}	1,1 (0,25) ^{aAB}	1,60 (0,18) ^a
	Media Tempo	1,29 (0,16) ^A	1,20 (0,24) ^A	2,63 (0,33) ^B	1,52 (0,21) ^A	
<i>DRB4</i>	Controle	1,15 (0,11) ^{aA}	0,60 (0,07) ^{aB}	1,05 (0,15) ^{aA}	0,39 (0,5) ^{aB}	0,79 (0,05) ^a
	Infectado	1,80 (0,23) ^{ba}	0,81 (0,07) ^{bb}	1,38 (0,15) ^{aA}	0,65 (0,08) ^{bb}	1,20 (0,07) ^b
	Media Tempo	1,47 (0,13) ^A	0,70 (0,05) ^B	1,21 (0,10) ^A	0,52 (0,05) ^C	
<i>DRB5</i>	Controle	0,95 (0,11) ^{aA}	0,73 (0,11) ^{aA}	0,31 (0,06) ^{aB}	0,3 (0,03) ^{aB}	0,57 (0,04) ^a
	Infectado	0,28 (0,05) ^{ba}	0,45 (0,03) ^{bb}	0,35 (0,10) ^{aAB}	0,36 (0,03) ^{aAB}	0,36 (0,03) ^b
	Media Tempo	0,61 (0,06) ^A	0,9 (0,06) ^A	0,33 (0,06) ^B	0,33 (0,02) ^B	

Valores médios e respectivos desvios-padrão (entre parênteses). Análises realizadas através do método de Equações de Estimativas Generalizadas (GEE). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ao nível de $p < 0,05$. Letras minúsculas distintas mostram diferenças na expressão gênica entre o grupo controle e infectado por *C. higginsianum* em cada tempo analisado. Letras maiúsculas distintas mostram variações da expressão gênica dentro de cada grupo (controle e infectado) em relação aos tempos analisados.