**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Análise da via de regulação gênica do miRNA156/SPL na brotação lateral e caracterização molecular do processo de emergência da gema axilar de cana de açúcar

Fausto Andrés Ortiz–Morea

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia
e Bioquímica de Plantas**

**Piracicaba
2010**

Fausto Andrés Ortiz–Morea
Ingeniero Agroecologo

**Análise da via de regulação gênica do miRNA156/SPL na brotação lateral e
caracterização molecular do processo de emergência da gema axilar de
cana de açúcar**

Orientador:
Prof. Dr. **FÁBIO TEBALDI SILVEIRA NOGUEIRA**

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia
e Bioquímica de Plantas**

Piracicaba
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Ortiz-Morea, Fausto Andrés

Análise da via de regulação gênica do miRNA 156/SPL na brotação lateral e caracterização molecular do processo de emergência da gema axilar de cana de açúcar / Fausto Andrés Ortiz-Morea. - Piracicaba, 2010.
170 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Brotação 2. Cana de açúcar 3. Perfilhação 4. 5. Regulação gênica 6. RNA
Transferência de genes 8. Variação genética em plantas I. Título

CDD 633.61
O77a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

A toda minha família

Aos meus pais Ernes e Marina pelo amor, pela minha formação e incondicional apoio

Aos meus irmãos Julian e Nicolas, grandes amigos e companheiros

Aos meus sobrinhos Yulian e Dana; quem com sua chegada trouxeram toneladas de felicidade

A minha avó Mercedes, quem desde o céu continua presente.

DEDICO

A Deus que faz que o impossível seja possível

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Fábio T. S. Nogueira, pela orientação, amizade, pela paciência, pelo respeito e por acreditar em mim. Sinceramente sou muito grato a você.

À profa. Dr. Helaine Carrer, a qual deixou de portas abertas o laboratório de Biologia Molecular e genômica de Plantas (CEBTEC, ESALQ/USP), onde pude desenvolver meu trabalho.

Ao Dr. Ênio Thiago de Oliveira por sua amizade, pelo apoio, conselhos e pela orientação na cultura de tecidos.

À MSc. Valentina de Fátima de Martin, pela disposição, pelo carinho, e pelos puxões de orelhas que fizeram parte da minha formação.

Ao prof. Dr. Luiz Antonio Gallo por sua disposição e por ter me aceitado inicialmente como seu orientado.

A Adriana Marcela, pelo convívio, apoio, e, sobretudo por ter compartilhado meus sonhos e objetivos.

À Ana Olaya, pelos conselhos, por suas orações e por dar aquela força quando mais precisei.

A Maria Solizete G. Silva do PPG em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pelo grande auxílio.

Aos colegas e grandes amigos, Geraldo F. F. e Silva, Eduardo Picelli, Frederico de Almeida de Jesus, Marcelo Rogalski, Tábata Bergonci, Elaine, Esteban Galeano, Evandro Tambarussi, Giovanni Rossi, Daniel Ramiro, pelo convívio, pelo aprendizado compartilhado, pelo apoio, e pelos bons momentos, na verdade foi muito legal conhecer pessoas como vocês.

A todos os integrantes do Centro de Tecnologia Agrícola (CEBTEC), do departamento de Ciências Biológicas da ESALQ/USP, especialmente ao prof. Daniel Scherer, prof. Murilo Melo, Amaral, Juan, Tatiana, Carina, André, Martha, Simone, Olegth Rojas, Felipe, Gisela Ortiz, Roberto, Vinicius, pelo apoio, companheirismo e convívio.

À colônia Colombiana e peruana da ESALQ-USP, com quem compartilhei muitos momentos felizes.

Aos meus familiares e amigos que mesmo a distância torceram e acreditaram em mim e na consecução desta conquista.

Ao programa PEC-PG, pela concessão desta bolsa de estudos.

A Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo, pela oportunidade e realização deste trabalho e por ter me permitido acesso a um ensino de qualidade.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Revisão bibliográfica	18
1.1.1 Cana de açúcar	18
1.1.2 Brotação lateral	20
1.1.3 Brotação lateral em cana de açúcar	24
1.1.4 MicroRNAs	25
1.1.5 MicroRNAs e seus efeitos em plantas.....	30
Referências	32
2 ANÁLISE DA VIA miRNA156/FATORES DE TRANSCRIÇÃO DO TIPO SQUAMOSA NO ESTUDO DO PERFILHAMENTO DE CANA DE AÇÚCAR.....	43
Resumo	44
Abstract.....	
2.1 Introdução	44
2.2 Material e métodos.....	46
2.2.1 Predição <i>in silico</i> de potenciais genes-alvos do miRNA156 em cana de açúcar (<i>Saccharum spp</i>).....	47
2.2.2 Análise Filogenética dos mRNAs-alvo do SsmiRNA156b/c.....	48
2.2.3 Material Vegetal.....	48
2.2.4 Isolamento e quantificação de ácidos nucleicos.....	49
2.2.4.1 Isolamento e quantificação de DNA genômico	49
2.2.4.2 Isolamento, tratamento com <i>DNaseI</i> e quantificação de RNA total	49
2.2.5 Síntese de cDNA via <i>pulsed stem-loop</i> RT-PCR	50
2.2.6 Perfil espacial da expressão do SsmiR156 maduro e um de seus genes alvos em cana de açúcar.....	51
2.2.7 Construção do vetor de transformação genética com o gene <i>SsmiR156b/c</i>	52
2.2.8 Obtenção de tecido alvo para transformação de cana de açúcar	54
2.2.9 Transformação genética de cana de açúcar.....	55
2.2.10 Regeneração de plantas e seleção de transformantes	56

2.2.11 Confirmação de eventos de transformação.....	57
2.2.12 Análise de acúmulo de transcritos do <i>SsmiR156</i> maduro em plantas transgênicas.	58
2.3 Resultados e discussão	60
2.3.1 Identificação de genes alvo do <i>SsmiR156</i> e sua análise filogenética.....	60
2.3.2 Perfil espacial da expressão do <i>miR156</i> maduro e um de seus genes alvo em cana de açúcar.	63
2.3.3 Análise da seqüência do precursor do <i>Ssmir156b/c</i>	65
2.3.4 Transformação genética de cana de açúcar e seleção de transformantes.	67
2.3.5 Análise do acúmulo do <i>SsmiR156</i> maduro em plantas transformadas.	70
2.4 Conclusões	75
Referências.....	76
3 BASES MOLECULARES DO PROCESSO DE EMERGÊNCIA DA GEMA AXILAR EM CANA DE AÇÚCAR.	81
Resumo	81
Abstract.....	
3.1 Introdução.....	82
3.2 Matérias e métodos	84
3.2.1 Identificação de seqüências de genes de interesse e sua análise filogenética. ...	84
3.2.2 Material vegetal.....	85
3.2.3 Cortes histológicos de gemas em diferentes estágios do desenvolvimento	85
3.2.4 Identificação de miRNAs conservados expressos em gema axilar de cana de açúcar.	86
3.2.5 Análises de expressão gênica e acúmulo de miRNAs nas etapas iniciais da emergência da gema axilar.	87
3.2.7 Confirmação da clivagem de genes alvo de miRNAs por 5' RACE	88
3.3 Resultados e discussão	90
3.3.1 Identificação <i>in silico</i> de seqüências de genes de interesse e sua análise filogenética.....	90
3.3.2 Acompanhamento visual e histológico da emergência da gema durante seus primeiros estágios de desenvolvimento.	97
3.3.3 Geração de bibliotecas de pequenos RNAs expressos em gema axilar.....	99

3.3.4 Identificação de miRNAs conservados expressos na gema.....	100
3.3.5 Análise de expressão gênica e acúmulo de miRNAs maduros nas etapas iniciais da emergência de gemas axilares em cana de açúcar.	103
3.3.5.1 Perfil de expressão do gene <i>Ssknotted1</i>	104
3.3.5.2 Perfil de expressão do gene <i>Sstb1</i>	105
3.3.5.3 Perfil de expressão do gene <i>SsERF3</i>	108
3.3.5.4 Perfil de expressão do gene <i>SsAXL</i> e <i>SsPIN1</i>	110
3.3.5.5 Perfil de expressão do gene <i>SsGAMyB</i> e acúmulo do seus regulares, os microRNAs <i>SsmiR159</i> e <i>SsmiR319</i>	113
3.3.5.6 Perfil de expressão do gene <i>SsSPL1</i> e acúmulo do <i>SsmiR156</i> e <i>SsmiR529</i> ...	117
3.3.5.7 Perfil de expressão do gene <i>SsDCL1</i>	121
3.4 Conclusões.....	122
Referências	124
ANEXOS.....	133

RESUMO

Análise da via de regulação gênica do miRNA56/SPL na brotação lateral e caracterização molecular do processo de emergência da gema axilar de cana de açúcar

Atualmente a cultura da cana de açúcar tem ganhado destaque no cenário mundial devido a seu potencial uso na produção de bioenergia o qual poderia ser beneficiado desenvolvendo-se cultivares com aumento da produtividade de biomassa por unidade de área, o que é por sua vez, determinada pela arquitetura da planta. A brotação lateral é um dos principais fatores que regulam a arquitetura dos vegetais. Recentemente, esta fase do desenvolvimento tem sido estudada intensivamente em plantas consideradas modelo, elucidando em parte as vias genéticas, ambientais e hormonais que regulam este processo. Dentro desta vias, microRNAs, uma classe de pequenos RNAs não codantes que modula pós-transcricionalmente a expressão de genes endógenos, parecem ser importantes reguladores. Em cana de açúcar, a brotação lateral é importante para a arquitetura dos ramos laterais, germinação de gemas e perfilhamento. Entretanto, devido a sua complexidade genética e ausência de mutantes defectivos na brotação lateral, estudos nesta área ao nível molecular são limitados. Neste contexto, este trabalho teve por objetivos estudar em cana de açúcar a via microRNA156/fatores de transcrição do tipo *SQUAMOSA promoter-binding-protein* (SPL), a qual é associada à regulação do perfilhamento, bem como caracterizar molecularmente o processo de emergência de gemas axilares. Ferramentas computacionais usando o banco publico de *ESTs TIGR gene index* permitiram identificar e classificar no genoma de cana de açúcar, diferentes genes associados ao processo de brotação lateral e resposta hormonal. Entre estes, seis genes *SPL* regulados pelo miR156 foram identificados, sendo um deles (*SsSPL1*) homólogo a *SPLs* envolvidas diretamente na regulação do perfilhamento. A expressão da *SsSPL1* foi monitorada em diferentes tecidos e órgãos, juntamente com o miR156. Os dados sugerem que a *SsSPL1*, é regulada negativamente pelo miR156, sendo esta via também conservada em cana de açúcar. Foram geradas plantas transgênicas da cultivar RB85486 com o gene endógeno *SsmiR156a/b* o qual codifica um precursor conservado do miR156 e parece estar associado com a evolução da arquitetura em monocotiledôneas. O acúmulo do miR156 foi avaliado em plantas transformadas via RT-qPCR encontrando variabilidade na sua expressão. Bibliotecas de pequenos RNAs foram geradas em gemas dormentes e em desenvolvimento, permitindo identificar membros de 26 famílias de miRNAs. A expressão de quatro deles, de seus genes-alvo e de outros genes selecionados foi monitorada em gemas dormentes e com 2 e 5 dias após o plantio. Interessantemente, o miR159 foi o mais expresso em gemas axilares de cana e parece ser um fator chave na emergência da gema, já que, segundo os resultados obtidos, esse miRNA parece modular a expressão do seu gene alvo *SsGAMyB*, o qual é um fator de transcrição implicado na ativação de genes de resposta a giberelina. Durante esta fase inicial do desenvolvimento também foi observado alterações na expressão de genes associados com processos de transdução de sinal associados aos fitohormônios auxina e etileno. Os resultados obtidos indicam que a emergência de gemas laterais é um processo dinâmico em que fitohormônios, fatores de transcrição e microRNAs participam conjuntamente para promover o crescimento e

desenvolvimento da nova plântula de cana de açúcar.

Palavras-chave: Brotação lateral; Perfilhamento; MicroRNAs; Cana-de-açúcar; Gema axilar; Transformação genética

ABSTRACT

Analysis of the role(s) of the miRNA156/SPL pathway on branching/tillering and molecular characterization of sugarcane lateral bud outgrowth

Sugarcane is an economically important biofuel crop that recently has become a target for improvement of sustainable biomaterial production due to its high biomass productivity and built-in containment features. Therefore, studies aiming to improve the production of biomass per area are among the most important issues in sugarcane production. Plant biomass is defined, at least in part, by its shoot architecture. Although shoot architecture (branching/tillering) is to some extent influenced by environmental factors, it is determined mainly by the plant's genetic program. This includes developmental programs that are regulated by a complex network of genetic pathways that integrate endogenous and environmental cues. Several transcription factors as well as microRNAs are likely part of this network. In this study, we started to investigate the roles of the genetic pathway regulated by the microRNA156 and its targets, the transcription factors SQUAMOSA promoter-binding-protein (SPLs) in sugarcane branching/tillering. We identified six members of the SPL family that were further classified into four subfamilies. In both dicots and monocots, these SPLs are key regulators of the plant shoot architecture. We monitored the expression patterns of SsmiR156 and *SsSPL1* in distinct sugarcane tissues/organs. Our observations suggest that miR156 regulates posttranscriptionally *SsSPL1* mainly in leaf tissues. We generated transgenic sugarcane plants overexpressing the monocot-specific sugarcane miR156 precursor *SsMIR156b/c* via biolistic method. This precursor is thought to be important for the evolution of grass shoot architecture. Although we observed higher accumulation of mature SsmiR156b/c in leaf tissues of some transgenic plants as compared with tissues from non-transgenic plants, we could not detect any significant changes in their vegetative architecture. Using deep sequencing approaches, we have generated two small RNA libraries from dormant and outgrown sugarcane lateral buds. Preliminary analyses indicate that a select group of small RNAs are expressed in lateral buds, including over 200 repeat-associated small interfering RNAs (rasiRNAs) and 25 conserved microRNAs (miRNAs). Amongst the miRNAs, miR159 was the most sequenced in the two libraries. We evaluated miR159 accumulation pattern in addition to other selected miRNAs via qRT-PCR in dormant and developing buds. The majority of the evaluated miRNAs accumulate differentially during bud development, though with distinct expression patterns. Interestingly, miR159 accumulates at high levels in dormant buds, but scarcely in developing buds. Conversely, the experimentally confirmed miR159 target, a sugarcane GAMyB-like gene (*SsGAMyB*), is lowly expressed in dormant buds while its transcripts accumulate at higher levels in developing buds. GAMyB-like genes encode R2R3 MYB domain transcription factors that have been implicated in gibberellin (GA) and abscisic acid (ABA) signaling in germinating seeds. Our data suggest miR159 regulates GAMyB-like genes during sugarcane bud outgrowth. Similarly, *SsSPL1* is regulated posttranscriptionally by the miR529, though this gene has sites for both miR529 and miR156. Auxin and ethylene-associated regulatory pathways are affected during sugarcane bud development. Taken together,

our data indicate that sugarcane bud outgrowth from rhizomes is a complex developmental process involving hormones, transcription factors as well as microRNAs and other regulatory RNAs.

Keywords: Bud outgrowth; Tillering; MicroRNAs; Sugarcane; Axillary bud; Genetic transformation

1 INTRODUÇÃO

A cana de açúcar é uma das principais espécies agrícolas cultivadas mundialmente, representando um setor econômico e social importante para o desenvolvimento dos locais em que tem sido cultivada. O Brasil é o maior produtor de cana de açúcar do mundo, sendo responsável por 40% da produção mundial (FAO, 2008). A indústria canavieira no Brasil mantém o maior sistema de produção de energia comercial a partir de biomassa, tanto por meio do etanol quanto pelo uso do bagaço, sendo o último uma possível fonte alternativa para a questão energética. Além disso, a cultura de cana de açúcar é a base para a independência do Brasil em relação aos combustíveis fósseis (LAWRENCE; WALBOT, 2007). A região Sudeste detém 60% da produção nacional, sendo a maioria das lavouras de cana de açúcar concentrada no Estado de São Paulo. O crescente interesse da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) em estudar o genoma da cana de açúcar e a implementação do programa SUCEST (VETTORE et al., 2003) são também provas da importância econômica desta cultura para o País.

A arquitetura dos ramos laterais de plantas é um importante fator agrônomo que determina a produção no campo. A formação de gemas axilares/laterais e sua posterior brotação são fatores-chave que controlam a arquitetura dos ramos laterais. A capacidade de formação de ramos laterais afeta tanto a biomassa foliar quanto o número de inflorescências (DOUST, 2007). Em cana de açúcar, o desenvolvimento da gema axilar é importante não somente para a arquitetura dos ramos laterais, mas também para a germinação e perfilhamento. Na maioria das espécies vegetais, a brotação das gemas laterais é inibida pelo meristema apical e/ou inflorescência primária, sendo esse fenômeno conhecido como dominância apical (SHIMIZU-SATO; MORI, 2001). A transição do estágio dormente para o estágio ativo de desenvolvimento da gema axilar constitui um fenômeno complexo que inclui resposta a fatores ambientais, modificações na expressão gênica (SCHMITZ; THERES, 2005; DOUST, 2007), e alteração na produção e percepção de fitohormônios, dentre os quais se destacam principalmente auxina, citocinina, giberelina e estrigolactonas (BREWER et al., 2009; LEYSER, 2009). O melhor entendimento das bases fisiológicas e moleculares

que contribuem para o desenvolvimento da gema axilar e posterior perfilhamento é relevante para obtenção de melhor eficiência de germinação e alteração da arquitetura dos ramos laterais em cana-de-açúcar, respectivamente. O aumento dessa eficiência pode levar ao aumento de biomassa total, o que é uma característica desejável para espécies utilizadas como fontes de biocombustíveis.

Vários genes foram descritos como sendo importantes para formação de gemas laterais e sua posterior brotação, muitos deles correspondendo a fatores de transcrição (FTs). FTs exercem um papel essencial na rede regulatória do desenvolvimento vegetal. A expressão espacial e temporal de alguns FTs pode mudar a identidade celular ou de um conjunto de tecidos, regulando a expressão de uma ampla gama de genes (XIE; WU; XIONG, 2006).

Apesar do grande avanço na identificação de genes envolvidos na regulação da formação, dormência e desenvolvimento das gemas axilares, pouco é conhecido sobre a regulação de tais genes. Interessantemente, vários membros de famílias gênicas associadas à brotação lateral estão sujeitos à regulação pós-transcricional, via microRNAs (miRNAs), os quais podem também interagir com fitohormônios (LIU; CHEN, 2009). Tal interação pode ser fundamental para a formação e desenvolvimento de gemas axilares.

miRNAs são uma classe de pequenos RNAs não codantes endógenos de 20-22 nucleotídeos (nt) que regulam a expressão gênica pós-transcricionalmente. MiRNAs são produzidos a partir de precursores longos (pri-miRNAs), os quais são posteriormente processados por enzimas específicas, gerando o miRNA maduro. O miRNA maduro, por sua vez, guia a clivagem do mRNA de genes-alvo e bloqueia a tradução de proteínas. Desde que foram reportados em plantas em 2002, várias evidências sugerem que esses pequenos RNAs são reguladores chaves em diversos aspectos do desenvolvimento vegetal

Em cana-de-açúcar, foram recentemente identificados computacionalmente 19 pri-miRNAs distintos, os quais foram agrupados em 14 famílias (ZANCA et al., 2010), incluindo a família do microRNA156. Esse miRNA guia a clivagem de membros da família de fatores de transcrição do tipo SQUAMOSA (SQUA) promoter-binding-protein

(SPL), a qual é específica de plantas (KLEIN; SAEDLER; HUIJSER, 1996). Os genes *SPLs* foram primeiramente caracterizados como reguladores da expressão de genes *MADS-box* no florescimento precoce de *Antirrhinum majus* (KLEIN; SAEDLER; HUIJSER, 1996). Desde então, tais FTs vem sendo identificados em várias espécies vegetais, incluindo algas verdes. Os genes *SPLs* exercem papel fundamental na regulação do florescimento, no desenvolvimento do fruto, transição da fase juvenil-adulta (heteroblastia), bem como em outros processos fisiológicos (SCHWAB et al., 2005; CHUCK et al., 2007).

Interessantemente, a superexpressão do miRNA156 em arabidopsis promove severa redução na dominância apical, levando a uma maior produção de ramos laterais. Fenótipo similar é observado em milho (CHUCK et al., 2007), demonstrando que o controle da brotação lateral via miRNA156/SPL é conservado em monocots e eudicots. Embora seja evidente o papel dessa via na formação de ramos axilares, até o momento não há estudos elucidando quais vias genéticas e regulatórias de brotação lateral são alteradas em resposta a expressão ectópica do miRNA156. O estudo de tais vias pode contribuir significativamente para o entendimento da formação da arquitetura vegetal e aumento de biomassa, o que pode ser usado com fins biotecnológicos principalmente em plantas de interesse comercial como a cana de açúcar.

Neste contexto, esta pesquisa teve como objetivos centrais: (1) analisar a via de regulação gênica miR156/SPL no processo de brotação lateral e (2) investigar as bases moleculares associadas ao desenvolvimento da gema axilar-lateral de cana de açúcar. Para tanto foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- Identificar os possíveis alvos do miRNA156 em banco de dados de ESTs de cana de açúcar;
- Monitorar o padrão de expressão do miRNA156 e genes-alvo em diferentes órgãos vegetais de cana de açúcar;
- Analisar os efeitos da superexpressão do miRNA156 na produção de biomassa em plantas transgênicas de cana de açúcar;
- Monitorar o padrão de expressão de genes e microRNAs possivelmente associados à emergência de gemas axilares de cana de açúcar.

Diante do exposto, a presente dissertação é apresentada em três capítulos: **O primeiro** constitui uma introdução e revisão bibliográfica do assunto abordado. **No segundo** capítulo é analisada a via de regulação gênica miR156/SPL e caracterização funcional do miRNA156 em cana de açúcar. **O terceiro** aborda a avaliação molecular e histológica do processo de emergência da gema axilar/lateral em cana de açúcar.

1.1 Revisão bibliográfica

1.1.1 Cana de açúcar

A cana de açúcar é uma das mais importantes espécies cultivadas na região tropical e subtropical (MANNERS et al., 2004), contribuindo com aproximadamente 70% da produção mundial de açúcar (LAKSHMANAN et al., 2005). A cultura é usada também na produção de papel, alimentação animal e principalmente álcool, produto que está se tornando cada dia mais importante no cenário mundial, principalmente devido à busca constante de fontes renováveis de energia. Atualmente o Brasil consolidou-se como o maior produtor mundial de álcool, açúcar e derivados, sendo responsável por 40% da produção mundial de cana (FAO, 2008). Estima-se que a safra 2009/2010 atingiu 610 milhões de toneladas, gerando 4,5 milhões de empregos direto e indiretos, movimentando cerca de R\$ 56 bilhões, valor que representa 2% do PIB nacional (JORNAL CANA, 2010) cifras que mostram a importância desta cultura para o Brasil.

A cana de açúcar é uma espécie alógama, da família *Graminae* (*Poaceae*), pertencente ao gênero *Saccharum*, originária do sudeste asiático, cujo centro de diversidade e dispersão está localizado na região compreendida entre a Indonésia e Nova Guiné (MATSUOKA; GARCIA; ARIZONO, 2005). As cultivares atuais são derivadas de hibridações interespecíficas entre a espécie produtora de açúcar *S. officinarum* ($2n=80$) e a espécie selvagem *S. spontaneum* ($2n=40-128$), seguidas de uma série de retrocruzamentos com *S. officinarum* (MUDGE et al., 2009). Cruzamentos com *S. barberi* ($2n=60-140$) ou *S. sinense* ($2n=104-128$) e raramente com *S. robustum* ($2n=60-170$) também são reportados (MATSUOKA; GARCIA; ARIZONO, 2005). Como resultado deste processo, a cana de açúcar apresenta um complexo genoma aneuploide com um número de cromossomos que pode variar entre 100 e 130 (IRVINE,

1999; MANNERS et al., 2004; LAKSHMANAN et al., 2005). Deste número de cromossomos, 75% a 85% são derivados de *S. officinarum*, 15% a 20% de *S. spontaneum* e um 5% são produto de recombinação (DHONT et al., 1996; CUADRADO et al., 2004).

Neste contexto existe um crescente empenho em estudar o genoma da cana de açúcar, para tentar usar estas informações em programas de melhoramento. Produto deste interesse, o projeto brasileiro de seqüenciamento de “Expressed sequence tags” (ESTs) de cana de açúcar (SUCEST) gerou em 2003 aproximadamente 292 mil seqüências, agrupadas em aproximadamente 43 mil “clusters”, cada um dos quais representando um gene, com uma porcentagem de redundância de aproximadamente 20% (VETTORE et al., 2003). Recentemente, ESTs públicos do SUCEST foram agregados, juntamente com seqüências provenientes de outros projetos de seqüenciamento em cana, ao “The Gene Index Project” (121.342 seqüências únicas, release 3.0, <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi>), gerando uma vasta fonte para a análise da expressão gênica nessa espécie.

Atualmente a biologia molecular vem sendo cada vez mais empregada como ferramenta em programas de melhoramento de cana, permitindo a identificação e caracterização funcional de genes, assim como a introdução de genes de interesse agrônomo em cultivares—elite via transformação genética.

Entre os métodos de transformação genética, biolística é o principal método para transformação de cana (BIRCH, 1997). Neste método, o tecido-alvo é bombardeado com os microprojéteis (partículas de ouro ou tungstênio) cobertos de DNA que posteriormente pode ser integrado ao genoma da planta. Um dos fatores fundamentais no processo de transformação genética por biolística é a escolha do tecido alvo (GAMBLEY; FORD; SMITH, 1993), o qual deve representar um sistema eficiente de regeneração de plantas (LAKSHMANAN, 2006). Entre os diferentes tecidos testados para cana de açúcar, calos embriogênicos parecem ser bastante eficientes devido a sua alta taxa de transformação e regeneração, embora outros tipos de explantes têm sido usados para transformação por este método, tais como: meristemas apicais (GAMBLEY; FORD; SMITH, 1993), discos foliares imaturos e inflorescências (ELLIOTT et al., 2002), além de suspensão celular regenerável (FRANKS; BIRCH, 1991).

Recentemente, no laboratório da profa. Helaine Carrer, localizado no Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), foram geradas plantas transgênicas de cana de açúcar contendo genes de interesse agrônômico por meio da técnica biolística, usando como tecidos alvo tanto calos embriogênicos como discos foliares (PASSARIN, 2009; BARBOSA, 2010; JESUS, 2010; PICELLI, 2010).

Entretanto, métodos de transformação genética de cana ainda não são considerados ideais, devido à grande instabilidade ou ausência da expressão do transgene. Esses fatos podem ser atribuídos a varias razões, tais como o local de inserção e a integridade do transgene no genoma (BIRCH et al., 2000). O silenciamento gênico em cana de açúcar parece ser independente do número de cópias inseridas (BIRCH et al., 2000), mas dependente da integridade da inserção. Kohli et al. (1999) mostraram que a presença de uma ou mais cópias rearranjadas podem potencialmente levar ao silenciamento gênico, mesmo se outras cópias estão intactas ou funcionais (KOHLI et al., 1999). Até o momento não é são conhecido(s) o(s) exato(s) mecanismo(s) de silenciamento gênico em cana de açúcar, embora tenha sido demonstrado que este fenômeno pode acontecer tanto ao nível transcricional como pós-transcricional, via metilação de DNA e degradação do RNA, respectivamente (INGELBRECHT; IRVINE; MIRKOV, 1999; BIRCH et al., 2000).

1.1.2 Brotação lateral

A arquitetura aérea das plantas é um importante fator agrônômico que determina a produção no campo, sendo formada inicialmente pela atividade do meristema apical estabelecido durante a fase embrionária e posteriormente pela ação adicional de meristemas secundários que surgem nas axilas de folhas produzidas a partir do meristema primário (SCHMITZ; THERES, 2005; LEYSER, 2009). Meristemas axilares apresentam o mesmo potencial de desenvolvimento que o apresentado pelo meristema do qual eles foram derivados, porém, freqüentemente seu crescimento é restrito após a formação de alguns primórdios foliares não expandidos e permanecem dormentes na forma de gema axilar (ONGARO et al., 2008). Entretanto, as gemas axilares dormentes

podem posteriormente tornar-se ativas, seguindo o padrão de desenvolvimento da planta determinado geneticamente ou em resposta a modificações ambientais (SHIMIZU-SATO; MORI, 2001; LEYSER, 2009). Desta forma, a arquitetura vegetal pode ser determinada continuamente durante seu ciclo de vida.

O processo de brotação lateral pode ser descrito em três fases: formação dos meristemas axilares, formação das gemas axilares e sua posterior brotação (ramificação), envolvendo mudanças na proliferação e crescimento celular, acompanhadas por drásticas modificações na expressão gênica e ação hormonal (WANG; LI, 2008). Vários genes foram descritos na participação destes processos (MCSTEEN; LEYSER, 2005; SCHMITZ; THERES, 2005; DOUST, 2007; LEYSER, 2009).

A formação dos meristemas axilares começa com a definição de uma zona adaxial com alto potencial meristemático ao mesmo tempo em que a folha é formada. Esta zona poderá se desenvolver rapidamente no meristema axilar e este poderá permanecer num estado indiferenciado. Para a manutenção deste estado é necessária a expressão do gene *LATERAL SUPPRESSOR (LAS)* (MCSTEEN; LEYSER, 2005). Outros genes também têm sido reportados como importantes na formação do meristema axilar. Membros da classe III de fatores de transcrição do tipo HOMEODOMAIN LEUCINE ZIPPER (HD-ZIPIII) *REVOLUTA*, *PHABULOSA* e *PHAVOLUTA* controlam a posição onde serão formados os meristemas axilares (OTSUGA et al., 2001; EMERY et al., 2003). Genes do tipo *CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC)* desempenham papel importante na formação dos limites entre o meristema apical e primórdios foliares, o que é um pré-requisito para a identidade e formação da gema axilar (LAUFS et al., 2004). Em arroz (*Oryza sativa*), o gene específico de monocotiledôneas *LAX PANICLE1(LAX1)* é requerido na formação de meristemas axilares (OIKAWA; KYOZUKA, 2009). Genes do tipo *KNOTTED* têm funções associadas com o estabelecimento e manutenção de células pluripotentes nos meristemas (HAY; TSIANTIS, 2010). O fitohormônio auxina também é proposto como um regulador essencial neste processo, baseado nas observações de que a perda de função do gene *PINFORMED-1 (PIN)*, que codifica para proteína de membrana

associada ao transporte deste fitohormônio, resulta em plantas incapazes de formar órgãos laterais. Entretanto, esse processo pode ser revertido pela aplicação exógena de auxina (OKADA et al., 1991; REINHARDT; MANDEL; KUHLEMEIER, 2000).

A brotação das gemas após sua formação é um fenômeno complexo que inclui resposta a fatores ambientais, modificações na expressão gênica, e alteração na produção e percepção de fitohormônios (LEYSER, 2009), entre os quais se destacam auxina, citocinina (SHIMIZU-SATO; MORI, 2001), giberelina (RIEU et al., 2008) e estrigolactonas (BREWER, 2009). Em muitas espécies, a dormência das gemas é causada pelo efeito inibitório do meristema apical primário sobre o crescimento das gemas, sendo esse fenômeno conhecido como dominância apical (WANG; LI, 2008). Várias teorias têm sido exploradas tentando explicar a dominância apical, mas os exatos mecanismos controladores da brotação lateral ainda não são claros. Leyser (2009) propõe que a ativação da gema depende da sua capacidade para exportar auxina e suplementar-se de citocinina. Os autores propõem um modelo (modificado na Figura 1) em que a auxina produzida na parte aérea é transportada de maneira polar para as partes basais da planta, onde regula positivamente a síntese de estrigolactonas e negativamente a produção de citocinina. Estrigolactonas são transportadas para a parte aérea da planta regulando negativamente o transporte de auxina no caule, bloqueando, desta forma, o transporte de auxina produzida nas gemas para o caule principal.

Figura 1 - Modelo proposto para as vias hormonais que participam na regulação da brotação lateral (LEYSER, 2009)

Estudos de genética reversa e direta têm identificado alguns genes cuja atividade parece ser importante para o desenvolvimento da gema axilar, mas em muitos casos seu significado funcional ainda é desconhecido. O gene *TEOSINTE BRANCHED1* (*TB1*) é um dos melhores descritos. A expressão de *TB1* na gema axilar é associada à redução da ramificação lateral em milho e arroz (TAKEDA et al., 2003; DOEBLEY, 2004). *TB1* é um dos membros fundadores da família de fatores de transcrição do tipo TCP (*TEOSINTE BRANCHED1*, *CYCLOIDEA*, e *PCF*), os quais participam de diversos aspectos do desenvolvimento vegetal (CUBAS et al., 1999). Mutantes *max1-4* apresentam maior número de brotações laterais, sugerindo que tais genes são importantes fatores envolvidos na regulação da dominância apical. Genes *MAX* estão envolvidos no processo de biossíntese e transdução de sinal de estrigolactonas (GOMEZ-ROLDAN et al., 2008). Fatores de transcrição do tipo SQUAMOSA (*SQUA*) promoter-binding-protein (*SPL*), estão associados com o controle do número de brotações laterais (CHUCK et al., 2007; WANG et al., 2008). Recentemente, foi mostrado que plantas de arroz com maior expressão do gene *SPL14* apresentam reduzida brotação lateral (JIAO et al., 2010). Outro importante gene é o *AUXIN*

RESISTANT1 (*AXR1*), o qual codifica para enzima E1 do complexo de ativação de ubiquitinação de proteínas. Tal enzima parece ser requerida para a regulação dos níveis endógenos de citocinina e estrigolactonas (LEYSER, 2009). Além dos fatores genéticos, fatores ambientais tais como temperatura, intensidade de luz, fotoperíodo, umidade e disponibilidade de nutrientes, também influenciam a brotação lateral.

1.1.3 Brotação lateral em cana de açúcar

Em gramíneas, são descritos dois tipos de brotações vegetativas que diferem em tempo de iniciação e posição na planta: brotação do tipo perfilho e axilar. Na brotação tipo perfilho ou perfilhamento, a ramificação acontece em seqüência acrópeta nos estágios iniciais do desenvolvimento a partir de meristemas axilares formados nos nós basais do colmo. Estes perfilhos apresentam similaridade em forma e altura com o colmo principal. Na brotação tipo axilar, a ramificação acontece em seqüência basípeta a partir de gemas axilares formadas tardiamente nos nós superiores dos colmos. O desenvolvimento destas ramificações é geralmente suprimido quando a gema é formada (MCSTEEN; LEYSER, 2005; DOUST, 2007; YANG; HWA, 2008).

A morfologia de cana de açúcar é similar a de outras gramíneas (MILLER; GILBERT, 2006). Nos primeiros estágios de desenvolvimento da cana, os meristemas axilares localizados nos primeiros nós do colmo principal crescem convertendo-se em perfilhos. A maioria dos perfilhos surge ao nível do solo e desenvolvem seu próprio sistema radicular, permitindo-lhes uma independência parcial do caule principal. Em cana de açúcar, o potencial de perfilhamento é uma característica agrônômica crítica, associada diretamente ao número de colmos, que por sua vez é um dos principais determinantes na produção de sacarose e biomassa total.

As gemas formadas na parte aérea dos colmos permanecem em condição de dormência, embora elas mantenham o potencial de gerar uma nova planta quando colocadas em condições ambientais ótimas. Variedades comerciais dessa cultura são propagadas vegetativamente utilizando-se parte do caule (colmo), a qual contém uma ou duas gemas laterais (Figura 2) (FAUCONNIER, 1994). Após o plantio do colmo, a

gema axilar – que contém caule embrionário e primórdios foliares – germina (ou brota), dando origem aos ramos primários.

Figura 2 – Representação esquemática de seção do colmo de cana-de-açúcar contendo gema lateral. Retirado de www.sugarcane crops.com/p/growth_morphology

Na propagação vegetativa, as gemas axilares funcionam de maneira análoga a uma semente, passando de um estágio dormente com crescimento celular inibido para um estágio de crescimento ativo, dando origem a uma nova planta. Este processo é caracterizado por uma série de mudanças anatômicas e metabólicas. Em cana-de-açúcar, este processo tem sido pobremente caracterizado ao nível molecular. Um melhor entendimento das bases fisiológicas e moleculares da brotação lateral em cana de açúcar poderia ajudar na seleção e desenvolvimento de cultivares superiores com características associadas à germinação da gema, perfilhamento e capacidade de rebrota (LAKSHMANAN et al., 2005).

1.1.4 MicroRNAs

O funcionamento de organismos multicelulares depende de complexas vias de regulação gênica, algumas das quais pequenos RNAs (20–30 nt) não codantes têm emergido como componentes chaves, regulando a expressão gênica transcricional e pós-transcricionalmente (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009; CHEN, 2009; VOINNET, 2009). Com base na sua origem, estrutura, proteínas efetoras associadas e funções biológicas, estes pequenos RNAs são classificados em três grandes categorias:

microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs de interferência (siRNA) e RNAs que interagem com a enzima PIWI (piRNA) (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009) sendo a última específica de animais.

MiRNAs são codificados por genes *MIR* que se encontram amplamente distribuídos no genoma de plantas e animais (BARTEL, 2009; CHEN, 2009). Diferentes dos genes *MIR* em animais, os quais são localizados principalmente dentro de outros genes nas regiões intrônicas, a maioria dos genes *MIR* em plantas são encontrados em regiões intergênicas, apresentando suas próprias unidades de transcrição caracterizadas por uma região promotora e terminadora (MEGRAW et al., 2006; CUI et al., 2009; VOINET, 2009). MiRNAs regulam a expressão de seus genes alvo atuando principalmente ao nível pós-transcricional, por meio de interações RNA-RNA (HA et al., 2008). Entretanto, regulação da tradução de proteínas e da transcrição via metilação de DNA também tem sido reportadas (BRODERSEN et al., 2008; KHRAIWESH et al., 2010; WU et al., 2010).

Desde que miRNAs foram descritos, primeiro em animais e posteriormente em plantas (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993; LAGOS-QUINTANA et al., 2001; REINHART et al., 2002), vários avanços foram feitos para o melhor entendimento da sua biogênese, modo de ação e efeitos biológicos. Atualmente, é sabido que os dois reinos apresentam maquinaria similar, mas com algumas divergências na biogênese e funcionamento de miRNAs. Em plantas, a biossíntese de miRNAs é iniciada pela transcrição dos genes *MIR* via RNA polimerase II (Pol II), gerando um transcrito primário (pri-miRNA) cuja estrutura é semelhante a um mRNA, possuindo um *cap 7-metil-guanosina* na extremidade 5' e uma cauda poli-A na extremidade 3'; além disso, o pri-miRNA forma uma estrutura secundária tipo "hairpin" (LEE et al., 2004). Posteriormente o pri-miRNA é processado via a ação de diferentes enzimas, incluindo a enzima RNase III DICER-LIKE1 (*DCL1*), e gera o precursor intermediário ou pre-miRNA (VAUCHERET, 2006). O pre-miRNA é novamente processado pela enzima *DCL1*, dando origem a um duplex imperfeito de RNA (20-22 nt) que contém tanto o miRNA maduro quanto sua fita complementar (denominado miRNA*). Nesta fase a *DCL1* atua junto com duas proteínas nucleares: HYL(double-stranded RNA binding protein) e SERRATE (zinc finger protein) (HAN et al., 2004; LOBBES et al., 2006). O duplex miRNA-miRNA* é metilado

nas extremidades 3' pela ação de uma metiltransferase nuclear (*HEN1*), conferindo-lhe maior estabilidade e evitando sua degradação (YU et al., 2005). O *duplex* é subsequentemente transportado para o citoplasma por meio da enzima *HASTY* (PARK et al., 2005). Já no citoplasma, a dupla fita é desfeita pela ação de uma enzima helicase, ainda não identificada. Finalmente, o miRNA maduro é incorporado ao complexo de ribonucleoproteínas denominado RISC que contém a enzima *AGO1*, enquanto que o miRNA* é excluído do RISC e consequentemente exposto para degradação (JONES-RHOADES; BARTEL; BARTEL, 2006). A proteína *AGO1*, “guiada” pelo miRNA maduro, inibe a ação de genes alvo, podendo ocorrer via clivagem direta do transcrito ou repressão da tradução (Figura 3).

O mecanismo de ação é dependente do nível de complementaridade de bases entre o miRNA e o sítio alvo (AUKERMAN; SAKAI, 2003). Em plantas, a maioria de miRNAs apresentam alto grau de complementaridade com seus alvos (VOINNET, 2009). A clivagem direcionada pelo miRNA acontece usualmente no centro da complementaridade entre o miRNA e o mRNA, no resíduo que parecia com o décimo ou décimo primeiro nucleotídeo do miRNA (YANG; XUE; AN, 2007), sendo este fato confirmado em vários experimentos em que foi mapeada a região 5' do fragmento clivado, usando técnica modificada de RACE 5' (*rapid amplification of cloned ends*) (LLAVE et al., 2002; SOURET; KASTENMAYER; GREEN, 2004).

Figura 3 - Modelo da biogênese de miRNAs mecanismo de ação em plantas

MiRNAs são agrupados em famílias gênicas de acordo com a similaridade da sequência madura. Certas famílias possuem um grande número de membros (miR156, miR166, miR169), enquanto outras apenas um ou dois (miR162, miR390). Entretanto, esse número pode variar consideravelmente entre diferentes espécies vegetais (JONES-RHOADES, BARTEL, BARTEL, 2006). Em *arabidopsis*, 187 genes *MIR* foram agrupados em 42 famílias. Dentre essas, 21 famílias são conservadas em outras espécies vegetais, incluindo milho, arroz, sorgo e cana de açúcar (miRBase, release

15.0). Algumas famílias são conservadas mesmo em gimnospermas e na alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* (JONES-RHOADES; BARTEL; BARTEL, 2006; MOLNAR et al., 2007). Entretanto, outros miRNAs são conservados apenas em linhagens específicas; alguns exemplos são miR403 identificado somente em eudicotiledôneas (SUNKAR; ZHU, 2004) e o miR444 e miR528 que são específicos de monocotiledôneas (SUNKAR et al., 2005; ZHANG et al., 2009; ZANCA et al., 2010).

A maioria dos RNAs regulatórios, incluindo miRNAs, foi identificada pela construção e seqüenciamento em larga escala de bibliotecas de cDNA de populações de RNAs de baixo peso molecular (JONES-RHOADES; BARTEL; BARTEL, 2006). Novas técnicas de seqüenciamento estão permitindo a descoberta de miRNAs espécie-específico dentre as quais se destaca o método ILLUMINA/SOLEXA. Este método é baseado no seqüenciamento por síntese de moléculas de DNA fixadas numa superfície “*flowcell*”, usando nucleotídeos terminadores reversíveis marcados com diferentes fluorescências para cada base; os nucleotídeos são adicionados um de cada vez por uma DNA polymerase especial sendo detectada a fluorescência correspondente a essa posição. Posteriormente o grupo terminador localizado na extremidade 3’ junto com o marcador fluorescente é removido, permitindo a polimerização do seguinte nucleotídeo (MARDIS, 2008). Além do isolamento desses pequenos RNAs, abordagens computacionais são também utilizadas para a busca de precursores de miRNAs a partir de ESTs (ZHANG et al., 2005, 2007; ZANCA et al., 2010).

Após a identificação de miRNAs, o maior desafio consiste na caracterização de sua função biológica. A predição e validação experimental de seus alvos é um passo essencial para o cumprimento desta tarefa. Geralmente miRNAs em plantas apresentam alta complementaridade com região específica de seus mRNA alvos, permitindo a predição de genes alvos por meio do uso de algoritmos computacionais em banco de dados de ácidos nucléicos (JONES-RHOADES; BARTEL, 2004; YANG; XUE; NA, 2007; ALVES-JUNIOR et al., 2009). Entretanto, existem regras de pareamento, como por exemplo, o quase perfeito pareamento de bases na região 5’ do microRNA maduro, a ausência de não pareamento ou *mismatches* na região central de pareamento entre o miRNA e o mRNA-alvo (em geral, nas posições 9-12 nt da seqüência do miRNA) e a quantidade de *mismatches* totais no duplex formado.

Zanca e colaboradores (2010), usando seqüências de miRNAs conservados e bancos de dados de ESTs e *genomic survey sequences* (GSSs), identificaram 19 pri-miRNAs classificados em 14 famílias, das quais nove são específicas de monocotiledôneas. No mesmo trabalho, foi desenvolvida ferramenta computacional baseada em BLAST para identificar alvos de miRNAs usando seqüências de EST e BACs. Quarenta e seis seqüências alvo foram identificadas para as 14 famílias de miRNAs (ver Anexo A).

1.1.5 MicroRNAs e seus efeitos em plantas

Em plantas, miRNAs participam na regulação de vários processos associados ao desenvolvimento (CHEN, 2009; CHUCK; CANDELA; HAKE, 2009; NOGUEIRA et al., 2007, 2009), resposta a estresses bióticos e abióticos (SHUKLA; CHINNUSAMY; SUNKAR, 2008; RUIZ-FERRER; VOINET, 2009), transdução de sinal e degradação de proteínas (GUO et al., 2005; ZHANG et al., 2006).

No desenvolvimento, miRNAs participam em diferentes vias regulatórias da arquitetura da plantas afetando meristemas, folhas, raízes e inflorescências. Por exemplo, a expressão ectópica do miR156 em *arabidopsis* e milho promove severa redução na dominância apical, levando a uma maior produção de ramos laterais (SCHWAB et al., 2005; CHUCK et al., 2007). O miR156 regula a expressão de membros da família de fatores de transcrição SPL, os quais estão também envolvidos em mecanismos que regulam a transição da fase juvenil-adulta (heteroblastia) (CHEN, 2009). Alguns alvos do miR156 também podem ser regulados pelo miR529. Chuck et al. (2010) sugerem que a ação conjunta destes miRNAs em milho regulam a expressão do gene *tasselsheath4*, uma SPL envolvida na regulação do desenvolvimento de brácteas e no estabelecimento dos limites do meristema. Os miRNAs 165 e 166 estão associados ao estabelecimento da identidade abaxial de órgãos laterais, por meio da regulação de transcritos dos genes *HD-ZIPIII* (JUAREZ, 2004; NOGUEIRA et al., 2007, 2009). Vários outros casos de miRNAs associados ao desenvolvimento podem ser citados, tais como a regulação dos genes CUC1, 2 e 3 pelo microRNA 164 (LAUFS et al., 2004), a participação do miR172 na determinação de órgãos florais por regulação do gene APETALA2 (AUKERMAN; SAKAI, 2003; CHEN, 2004), regulação da formação

de estômatos pelo miR824 que tem como alvo o gene MADS-box AGL16 (KUTTER et al., 2007), entre outros. Além disso, o papel fundamental dos miRNAs no desenvolvimento de plantas foi exemplificado pelos defeitos pleiotrópicos apresentados por mutantes de *arabidopsis* defectivos na produção e ação de miRNAs. Por exemplo, o mutante nulo *dcl1* chega a ser letal na fase embrionária (RAMACHANDRAN; CHEN, 2008).

MiRNAs não atuam independentemente; eles estão imersos em complexas vias que incluem interações com fitohormônios (LIU; CHEN, 2009). Isto pode ser constatado pela presença de sítios de ligação nos promotores de miRNAs para fatores de transcrição do tipo ARF (Fatores de resposta à auxina) *LEAFY* (induzido por giberelina, ativa genes homeóticos florais) *MYC2* (Incrementa capacidade de resposta à seca por meio do aumento de sensibilidade à ABA), (MEGRAW et al., 2006). Além disso, alguns destes fatores de transcrição são regulados por miRNAs, indicando a existência de um complexo de regulação tipo “feedback”, como demonstrado em genes *MIR* em metazoários (MEGRAW et al., 2006). Como exemplo pode-se destacar os vários genes ARFs que são alvos dos miR160 e miR167 (CHEN, 2009). Interessantemente, alguns receptores de auxina são também sujeitos à regulação via miRNAs. MiR393 tem como alvo o gene *TIR1* e outros três genes codificando proteínas F-box (NAVARRO et al., 2006).

Recentes pesquisas têm identificado interações entre miRNAs e respostas hormonais, as quais providenciam bases para um melhor entendimento de sua ação nas plantas. MiR159 reprime a expressão de genes conservados *GAMYB-like* que codificam fatores de transcrição do tipo R2R3 Myb que são implicados na sinalização de GA em anteras e sementes (ALONSO-PERAL et al., 2010). Reyes e Chua (2007) mostraram em *arabidopsis* que ABA induz a produção de miR159 para regular a expressão de *GAMYB-like* na germinação de sementes sob condições de estresse hídrico. *GAMYB-like* em cana-de-açúcar foi reportado como alvo do miR319 (BARROSO, 2010). MiR319 está envolvido no controle do desenvolvimento da folha por meio da regulação dos níveis de jasmonato (SCHOMMER et al., 2008) e parece ser regulado negativamente por GA (LIU; CHEN, 2009). Embora estudos envolvendo miRNAs e sua relação com fitohormônios sejam relativamente novos, grandes

progressos têm sido feitos, evidenciando que pesquisas nesta área podem ajudar a desvendar as bases moleculares das interações sinérgicas de distintos fitohormônios nos diferentes processos de desenvolvimento das plantas.

Referências

- ALONSO-PERAL, M.; LI, J.; LI, Y.; ALLEN, R.; SCHNIPPENKOETTER, W.; OHMS, S.; WHITE, R.; MILLAR, A. The microRNA159-regulated GAMYB-like genes inhibit growth and promote programmed cell death in arabidopsis. **Plant Physiology**, Melbourne, v. 154, p. 757, 2010.
- ALVES-JUNIOR, L.; NIEMEIER, S.; HAUENSCHILD, A.; REHMSMEIER, M.; MERKLE, T. Comprehensive prediction of novel microRNA targets in *Arabidopsis thaliana*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 37, n. 12, p. 4010, 2009.
- AUKERMAN, M.; SAKAI, H. Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. **The Plant Cell Online**, Newark, v. 15, n. 11, p. 2730, 2003.
- BARBOSA, A.L. **Regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos e discos foliares visando transformação genética de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 2010. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
- BARROSO, F. **O microRNA que veio do frio: Regulação do miR319 durante estresse por frio em cana-de-açúcar**. 2010. 82 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
- BARTEL, D.P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, Cambridge, v. 136, n. 2, p. 215-233, 2009.
- BIRCH, R. Plant transformation: problems and strategies for practical application. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 297-326, 1997.
- BIRCH, R.; BOWER, R.; ELLIOTT, A.; HANSOM, S.; BASNAYAKE, S.; ZHANG, L. Regulation of transgene expression: progress towards practical development in sugarcane, and implications for other plant species. **Developments in Plant Genetics and Breeding**, Brisbane, v. 5, p. 118-125, 2000.
- BREWER, P.; DUN, E.; FERGUSON, B.; RAMEAU, C.; BEVERIDGE, C. Strigolactone acts downstream of auxin to regulate bud outgrowth in pea and Arabidopsis. **Plant Physiology**, Melbourne, v. 150, n. 1, p. 482-493, 2009.

BRODERSEN, P. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. **Science**, Washington, v. 320, n. 5880, p. 1185, 2008.

CARTHEW, R.W.; SONTHEIMER, E.J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, Cambridge, v. 136, n. 4, p. 642-655, 2009.

CHEN, X. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. **Science's STKE**, Washington, v. 303, n. 5666, p. 2022, 2004.

CHEN, X.M. Small RNAs and their roles in plant development. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 25, p. 21-44, 2009.

CHUCK, G.; CANDELA, H.; HAKE, S. Big impacts by small RNAs in plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, Albany, v. 12, n. 1, p. 81-86, 2009.

CHUCK, G.; CIGAN, A.M.; SAETEURN, K.; HAKE, S. The heterochronic maize mutant Corngrass1 results from overexpression of a tandem microRNA. **Nature Genetics**, New York, v. 39, n. 4, p. 544-549, 2007.

CHUCK, G.; WHIPPLE, C.; JACKSON, D.; HAKE, S. The maize SBP-box transcription factor encoded by tasselsheath4 regulates bract development and the establishment of meristem boundaries. **Development**, Albany, v. 137, n. 8, p. 1243, 2010.

CUADRADO, A.; ACEVEDO, R.; DE LA ESPINA, S.M.D.; JOUVE, N.; DE LA TORRE, C. Genome remodelling in three modern *S-officinarum* x *S-spontaneum* sugarcane cultivars. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 398, p. 847-854, Apr. 2004.

CUBAS, P.; LAUTER, N.; DOEBLEY, J.; COEN, E. The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development. **Plant Journal**, Oxford, v. 18, n. 2, p. 215-222, 1999.

CUI, X.; XU, S.M.; MU, D.S.; YANG, Z.M. Genomic analysis of rice microRNA promoters and clusters. **Gene**, Nanjing, v. 431, n. 1/2, p. 61-66, 2009.

DHONT, A.; GRIVET, L.; FELDMANN, P.; RAO, S.; BERDING, N.; GLASZMANN, J.C.A. Characterization of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp) by molecular cytogenetics. **Molecular & General Genetics**, New York, v. 250, n. 4, p. 405-413, 1996.

DOEBLEY, J. The genetics of maize evolution. **Genetics**, Madison, v. 38, n. 1, p. 37, 2004.

DOUST, A. Grass architecture: genetic and environmental control of branching. **Current Opinion in Plant Biology**, St. Louis, v. 10, p. 21-25, 2007.

ELLIOTT, A.; GEIJSKES, R.; LAKSHMANAN, P.; MCKEON, L.; WANG, N.; BERDING, N.; GROF, C.; SMITH, G. Direct regeneration of transgenic sugarcane following microprojectile transformation of regenerable cells in thin transverse section explants. In: INTERNATIONAL ASSOCIATION PLANT CULTURE BIOTECHNOLOGY, **Proceedings...** Orlando, 2002. p. 1376.

EMERY, J.; FLOYD, S.; ALVAREZ, J.; ESHED, Y.; HAWKER, N.; IZHAKI, A.; BAUM, S.; BOWMAN, J. Radial patterning of Arabidopsis shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. **Current Biology**, Davis, v.13, n. 20, p. 1768-1774, 2003.

FAO. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 06 out. 2010.

FAUCONNIER, R. **Sugar cane**: the tropical agriculturist. London: Macmillan, 1994. 140 p.

FRANKS, T.; BIRCH, R. Gene-transfer into intact sugarcane cells using microprojectile bombardment. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 18, p. 471-480, 1991.

GAMBLEY, R.; FORD, R.; SMITH, G. Microprojectile transformation of sugarcane meristems and regeneration of shoots expressing beta-glucuronidase. **Plant Cell Reports**, New York, v. 12, p. 343-346, 1993.

GOMEZ-ROLDAN, V.; FERMAS, S.; BREWER, P.; PUECH-PAGES, V.; DUN, E.; PILLOT, J.; LETISSE, F.; MATUSOVA, R.; DANOUN, S.; PORTAIS, J.; BOUWMEESTER, H.; BECARD, G.; BEVERIDGE, C.; RAMEAU, C.; ROCHANGE, S.. Strigolactone inhibition of shoot branching. **Nature**, Castanet-Tolosan, v. 455, p. 189-122, 2008.

GUO, H.; XIE, Q.; FEI, J.; CHUA, N. MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for Arabidopsis lateral root development. **The Plant Cell Online**, Singapore, v. 17, n. 5, p. 1376, 2005.

HA, M.; PANG, M. X.; AGARWAL, V.; CHEN, Z. J. Interspecies regulation of microRNAs and their targets. **Biochimica et Biophysica Acta-Genetic Regulatory Mechanisms**, Austin, v. 1779, n. 11, p. 735-742, 2008.

HAN, M. H.; GOUD, S.; SONG, L.; FEDOROFF, N. THE Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 4, p. 1093-1098, J2004.

HAY, A.; TSIANTIS, M. KNOX genes: versatile regulators of plant development and diversity. **Development**, Cambridge, v. 137, n. 19, p. 3153, 2010.

INGELBRECHT, I.; IRVINE, J.; MIRKOV, T. Posttranscriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploid genome. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 119, n. 4, p. 1187, 1999.

IRVINE, J. *Saccharum* species as horticultural classes. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 98, n. 2, p. 186-194, 1999.

JESUS, F.A. de. **Transformação genética de cana-de-açúcar com os genes da aquaporina SSpTIP1;1 e SspPIP1;4**. 2010. 55 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

JIAO, Y.; WANG, Y.; XUE, D.; WANG, J.; YAN, M.; LIU, G.; DONG, G.; ZENG, D.; LU, Z.; Zhu, X. Regulation of OsSPL14 by OsmiR156 defines ideal plant architecture in rice. **Nature Genetics**, New York, v. 42, p. 541-544, 2010.

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

JONES-RHOADES, M.; BARTEL, D.; BARTEL, B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, Cambridge, v. 57, p. 19-53, 2006.

JORNAL CANA. Disponível em: < <http://www.jornalcana.com.br>>. Acesso em 01 out. 2010.

JUAREZ, M.; KUI, J.; THOMAS, J.; HELLER, B.; TIMMERMAN, M. MicroRNA-mediated repression of rolled leaf1 specifies maize leaf polarity. **Nature**, London, v. 428, p. 84-88, 2004.

KHRAIWESH, B.; ARIF, M.; SEUMEL, G.; OSSOWSKI, S.; WEIGEL, D.; RESKI, R.; FRANK, W. Transcriptional control of gene expression by microRNAs. **Cell**, Freiburg, v. 140, n. 1, p. 111-122, 2010.

KLEIN, J.; SAEDLER, H.; HUIJSER, P. A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the *Antirrhinum majus* floral meristem identity gene SQUAMOSA. **Molecular & General Genetics**, New York, v. 250, n. 1, p. 7-16, 1996.

KOHLI, A.; GRIFFITHS, S.; PALACIOS, N.; TWYMAN, R.; VAIN, P.; LAURIE, D.; CHRISTOU, P. Molecular characterization of transforming plasmid rearrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the CaMV 35S promoter and confirms the predominance of microhomology mediated recombination. **The Plant Journal**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 591-601, 1999.

KUTTER, C.; SCHOB, H.; STADLER, M.; MEINS, F.; SI-AMMOUR, A. MicroRNA-mediated regulation of stomatal development in Arabidopsis. **Plant Cell**, Basel, v. 19, n. 11, p. 3831-3831, 2007.

LAGOS-QUINTANA, M.; RAUHUT, R.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science**, Washington, v. 294, n. 5543, p. 853-858, 2001.

LAKSHMANAN, P. Somatic embryogenesis in sugarcane: an addendum to the invited review 'sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Oxon, v. 42, n. 3, p. 201-205, 2006.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R.; WANG, L.; ELLIOTT, A.; GROF, C.; BERDING, N.; SMITH, G. Sugarcane biotechnology: The challenges and opportunities. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Gaithersburg, v. 41, n. 4, p. 345-363, 2005.

LAUFS, P.; PEAUCELLE, A.; MORIN, H.; TRAAS, J. MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in Arabidopsis meristems. **Development**, Versailles Cedex, v. 131, p. 4311-4322, 2004.

LAWRENCE, C.; WALBOT, V. Translational genomics for bioenergy production from fuelstock grasses: maize as the model species. **Plant Cell**, Ames, v. 19, p. 2091-2094, 2007.

LEE, R.C.; FEINBAUM, R.L.; AMBROS, V. The C-elegans heterochronic gene lin-4 encodes small rnas with antisense complementarity to lin-14. **Cell**, Cambridge, v. 75, n. 5, p. 843-854, 1993.

LEE, Y.; KIM, M.; HAN, J.J.; YEOM, K.H.; LEE, S.; BAEK, S.H.; KIM, V.N. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **Embo Journal**, Seoul, v. 23, n. 20, p. 4051-4060, 2004.

LEYSER, O. The control of shoot branching: an example of plant information processing. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 32, n. 6, p. 694-703, 2009.

LIU, Q.; CHEN, Y. Insights into the mechanism of plant development: Interactions of miRNAs pathway with phytohormone response. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Guangzhou, v. 384, n. 1, p. 1-5, 2009.

LLAVE, C.; KASSCHAU, K.; RECTOR, M.; CARRINGTON, J. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. **Science**, Washington, v. 297, n. 5589, p. 2053, 2002.

LOBBES, D.; RALLAPALLI, G.; SCHMIDT, D.D.; MARTIN, C.; CLARKE, J. SERRATE: a new player on the plant microRNA scene. **Embo Reports**, Colney, v. 7, n. 10, p. 1052-1058, 2006.

MANNERS, J.; MCINTYRE, C.; CASU, R.; CORDEIRO, G.; JACKSON, M.; AITKEN, K.; JACKSON, P.; BONNETT, G.; LEE, L.; HENRY, R. **Can genomics revolutionise genetics and breeding in sugarcane?** Brisbane: Australian Society of Agronomy, 2004.

MARDIS, E. Next-generation DNA sequencing methods. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, St. Louis, v. 9, n. 1, p. 387, 2008.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A.A.F.; ARIZONO, H. Melhoramento da cana-de-açúcar. In: BOREM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora UFV, 2005. p. 205-251.

MCSTEEN, P.; LEYSER, O. Shoot branching. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 56, p. 353 -374, 2005.

MEGRAW, M.; BAEV, V.; RUSINOV, V.; JENSEN, S. T.; KALANTIDIS, K.; HATZIGEORGIOU, A. G. MicroRNA promoter element discovery in Arabidopsis. **Rna-a Publication of the Rna Society**, Pennsylvania, v. 12, n. 9, p. 1612-1619, 2006.

MILLER, J.D.; GILBERT, R.A. **Sugarcane botany**: a brief view. Tampa: University of Florida, The Institute of Food and Agricultural Sciences Extension, 2006. 6 p.

MOLNAR, A.; SCHWACH, F.; STUDHOLME, D.; THUENEMANN, E.; BAULCOMBE, D. MiRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Nature**, London, v. 447 p. 1115-1126, 2007.

MUDGE, S.; OSABE, K.; CASU, R.; BONNETT, G.; MANNERS, J.; BIRCH, R. Efficient silencing of reporter transgenes coupled to known functional promoters in sugarcane, a highly polyploid crop species. **Planta**, Berlin, v. 229, n. 3, p. 549-558, 2009.

NAVARRO, L.; DUNOYER, P.; JAY, F.; ARNOLD, B.; DHARMASIRI, N.; ESTELLE, M.; VOINNET, O.; JONES, J. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. **Science**, Washington, v. 312, n. 5772, p. 436, 2006.

NOGUEIRA, F.; MADI, S.; CHITWOOD, D.H.; JUAREZ, MT. Timmermans MC (2007) Two small regulatory RNAs establish opposing fates of a developmental axis. **Genes Development**, New York, v. 21 p. 750-755, 2007.

NOGUEIRA, F.; CHITWOOD, D.H.; MADI, S.; OHTSU, K.; SCHNABLE, P.; SCANLON, M.; TIMMERMAN, P. Regulation of small RNA accumulation in the maize shoot apex. **Plos Genetics**, New York, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2008.

OIKAWA, T.; KYOZUKA, J. Two-step regulation of LAX PANICLE1 protein accumulation in axillary meristem formation in rice. **Plant Cell**, Tokyo, v. 21, p. 1095-1108, 2009.

OKADA, K.; UEDA, J.; KOMAKI, M.; BELL, C.; SHIMURA, Y. Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. **The Plant Cell Online**, Rockville, v. 3, n. 7, p. 677, 1991.

ONGARO, V.; BAINBRIDGE, K.; WILLIAMSON, L.; LEYSER, O. Interactions between axillary branches of *Arabidopsis*. **Molecular Plant**, York, v. 1, n. 2, p. 388-400, 2008.

OTSUGA, D.; DEGUZMAN, B.; PRIGGE, M.; DREWS, G.; CLARK, S. REVOLUTA regulates meristem initiation at lateral positions. **Plant Journal**, Salt Lake, v. 25, n. 1, p. 223-236, 2001.

PARK, W.; LI, J.; SONG, R.; MESSING, J.; CHEN, X.. Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Madison, v. 102, n. 10, p. 3691-3696, 2005.

PASSARIN, D.M.M. **Transformação genética de cana de açúcar por biolística e *Agrobacterium tumefaciens*, visando estudar o mecanismo de morte celular programada**. 2009. 147 p. Tese Doutorado (Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

PICELLI, E. **Cultura de tecidos e transformação genética com o gene *Ddm1* no estudo do silenciamento de elementos de transposição em cana-de-açúcar**. 2010. 140 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

RAMACHANDRAN, V.; CHEN, X. Small RNA metabolism in *Arabidopsis*. **Trends in Plant Science**, London, v. 13, n. 7, p. 368-374, 2008.

REINHARDT, D.; MANDEL, T.; KUHLEMEIER, C. Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. **The Plant Cell Online**, Rockville, v. 12, n. 4, p. 507, 2000.

REINHART, B.J.; WEINSTEIN, E.G.; RHOADES, M.W.; BARTEL, B.; BARTEL, D.P. MicroRNAs in plants. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 16, n. 17, p. 2313-2313, Sept. 2002.

REYES, J.; CHUA, N. ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination. **The Plant Journal**, Oxford, v. 49, n. 4, p. 592-606, 2007.

RIEU, I.; RUIZ RIVERO, O.; FERNANDEZ GARCIA, N.; GRIFFITHS, J.; POWERS, S.J.; GONG, F.; LINHARTOVA, T.; ERIKSSON, S.; NILSSON, O.; THOMAS, S.G. The gibberellin biosynthetic genes AtGA20ox1 and AtGA20ox2 act, partially redundantly, to promote growth and development throughout the Arabidopsis life cycle. **The Plant Journal**, Oxford, v. 53, n. 3, p. 488-504, 2008.

RUIZ-FERRER, V.; VOINNET, O. Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 60, p. 485-510, 2009.

SCHMITZ, G.; THERES, K. Shoot and inflorescence branching. **Current Opinion in Plant Biology**, Cologne, v. 8, n. 5, p. 506-511, 2005.

SCHOMMER, C.; PALATNIK, J.F.; AGGARWAL, P.; CHÉTELAT, A.; CUBAS, P.; FARMER, E.E.; NATH, U.; WEIGEL, D. Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. **PLoS Biol**, Madrid, v. 6, n. 9, p. 230, 2008.

SCHWAB, R.; PALATNIK, J.; RIESTER, M.; SCHOMMER, C.; SCHMID, M.; WEIGEL, D. Specific effects of MicroRNAs on the plant transcriptome. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 8, n. 5, p. 517-527, 2005.

SHIMIZU-SATO, S.; MORI, H. Control of outgrowth and dormancy in axillary buds. **Plant Physiology**, Nagoya, v. 127, n. 4, p. 1405, 2001.

SHUKLA, L.; CHINNUSAMY, V.; SUNKAR, R. The role of microRNAs and other endogenous small RNAs in plant stress responses. **Biochimica et Biophysica Acta**, Stillwater, v. 1779, n. 11, p. 743-748, 2008.

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

SUNKAR, R.; ZHU, J. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. **Science's STKE**, Riverside, v. 16, n. 8, p. 2001, 2004.

SUNKAR, R.; GIRKE, T.; JAIN, P.; ZHU, J. Cloning and characterization of microRNAs from rice. **The Plant Cell Online**, Rockville, v. 17, n. 5, p. 1397, 2005.

TAKEDA, T.; SUWA, Y.; SUZUKI, M.; KITANO, H.; UEGUCHI-TANAKA, M.; ASHIKARI, M.; MATSUOKA, M.; UEGUCHI, C. The OsTB1 gene negatively regulates lateral branching in rice. **Plant Journal**, Nagoya, v. 33, n. 3, p. 513-520, 2003.

VAUCHERET, H. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 20, n. 7, p. 759-771, 2006.

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

VOINNET, O. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. **Cell**, Cambridge, v. 113, n. 4, p. 669-687, 2009.

WANG, J.; SCHWAB, R.; CZECH, B.; MICA, E.; WEIGEL, D. Dual effects of miR156-targeted SPL genes and CYP78A5/KLUH on plastochron length and organ size in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell Online**, Rockville, v. 20, n. 5, p. 1231, 2008.

WANG, Y.H.; LI, J.Y. Molecular basis of plant architecture. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 253-279, 2008.

WU, L.; ZHOU, H.Y.; ZHANG, Q.Q.; ZHANG, J.G.; NI, F.R.; LIU, C.; QI, Y.J. DNA methylation mediated by a microRNA pathway. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 38, n. 3, p. 465-475, 2010.

XIE, K.; WU, C.; XIONG, L. Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice. **Plant Physiology**, Washington, v. 142, p. 280-293, 2006.

YANG, T.; XUE, L.; AN, L. Functional diversity of miRNA in plants. **Plant Science**, Limerick, v. 172, n. 3, p. 423-432, 2007.

YANG, X.; HWA, C. Genetic modification of plant architecture and variety improvement in rice. **Heredity**, London, v. 101, n. 5, p. 396-404, 2008.

YU, B.; YANG, Z.Y.; LI, J.J.; MINAKHINA, S.; YANG, M.C.; PADGETT, R.W.; STEWARD, R.; CHEN, X.M. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. **Science**, Washington, v. 307, n. 5711, p. 932-935, 2005.

ZANCA, A.; VICENTINI R.; ORTIZ F.; DEL BEM, L.; SILVA M.; VINCENTZ, M.; NOGUEIRA, F. Identification and expression analysis of microRNAs and targets in the biofuel crop sugarcane. **BMC Plant Biology**, Michigan, v. 10, n. 1, p. 260-269, 2010.

ZHANG, B.; PAN, X.; WANG, Q.; COBB, G.; ANDERSON, T. Computational identification of microRNAs and their targets. **Computational Biology and Chemistry**, Oxford, v. 30, n. 6, p. 395-407, 2006.

_____. Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis. **Cell Research**, New York, v. 15, n. 5, p. 336-360, 2005.

ZHANG, B.; WANG, Q.; WANG, K.; PAN, X.; LIU, F.; GUO, T.; COBB, G.P.; ANDERSON, TA. Identification of cotton microRNAs and their targets. **Gene**, Amsterdam, v. 397, n. 1/2, p. 26-37, 2007.

ZHANG, J.; XU, Y.; HUAN, Q.; CHONG, K. Deep sequencing of *Brachypodium* small RNAs at the global genome level identifies microRNAs involved in cold stress response. **BMC Genomics**, Michigan, v. 10, n. 1, p. 449, 2009.

2 ANÁLISE DA VIA miRNA156/FATORES DE TRANSCRIÇÃO DO TIPO SQUAMOSA NO ESTUDO DO PERFILHAMENTO DE CANA DE AÇÚCAR

Resumo

A cana de açúcar possui grande importância sócio-econômica ao nível mundial, sendo considerada a cultura mais eficiente na produção de bioenergia em regiões tropicais e subtropicais, característica que a destaca em relação a outras culturas ante a necessidade crescente de substituição de combustíveis de origem fóssil por aqueles de origem vegetal. Por essa razão, uns dois principais focos dos programas de melhoramento de cana de açúcar é a geração de plantas com um incremento na produção de biomassa por unidade de área que, por sua vez, está associada à arquitetura da planta. Atualmente, complexas redes de regulação que incluem modificações na expressão gênica e alteração na produção e percepção de fitohormônios durante o desenvolvimento estão sendo associadas à determinação da arquitetura vegetal, mas a maioria dos estudos são feitos em plantas consideradas modelo e pouco é conhecido em cana de açúcar. Dentre estas redes, uma classe de pequenos RNAs não codantes de 20-22 nucleotídeos, denominada microRNAs (miRNAs), parecem desempenhar papéis importantes na formação da arquitetura vegetal. Neste estudo, foi analisada a via associada à regulação do perfilhamento modulada pelo miR156 e seus genes alvo, os quais são membros da família de fatores de transcrição do tipo SQUAMOSA promoter-binding-protein (SPLs). Inicialmente, mediante estudos computacionais, foram identificados seis genes alvo do SsmiR156 de cana de açúcar em bancos públicos. O acúmulo do SsmiR156 e um de seus genes alvo foi avaliado em diferentes tecidos/órgãos em um híbrido comercial de cana de açúcar, encontrando-se correlação negativa entre o acúmulo deste miRNA e o acúmulo de transcritos intactos de seu gene alvo, confirmando sua regulação pós-transcricional. Com o objetivo de obter plantas com um aumento de biomassa e elucidar os efeitos da superexpressão do miR156, plantas da cultivar RB835486 foram transformadas com o gene endógeno *SsMIR156b/c* via biolística. Este gene codifica um precursor do miR156 caracterizado por produzir duas seqüências maduras e parece estar associado com a evolução da arquitetura vegetal de monocotiledôneas. O acúmulo do miR156 foi avaliado em plantas transgênicas via RT-qPCR, encontrando-se variabilidade na sua expressão nos diferentes eventos de transformação. Algumas plantas transformadas apresentam diminuição no acúmulo do miR156 em relação a plantas selvagens, sugerindo que a inserção do transgene em seu genoma desencadeou mecanismos de silenciamento gênico que culminaram na redução de expressão do transgene e dos precursores endógenos. Até o momento não foi possível correlacionar plantas transformadas apresentando maior acúmulo do miR156 com o aumento do perfilhamento.

Palavras-chave: Cana de açúcar; MicroRNAs; Fatores de transcrição SPL; Perfilhamento; Transformação genética

Abstract

Sugarcane is an economically important biofuel crop that recently has become a target for improvement of sustainable biomaterial production due to its high biomass productivity and built-in containment features. Therefore, studies aiming to improve the production of biomass per area are among the most important issues in sugarcane production. Plant biomass is defined, at least in part, by its shoot architecture. Although shoot architecture (branching/tillering) is to some extent influenced by environmental factors, it is determined mainly by the plant's genetic program. This includes developmental programs that are regulated by a complex network of genetic pathways that integrate endogenous and environmental cues. Several transcription factors as well as microRNAs are likely part of this network. In this study, we started to investigate the roles of the genetic pathway regulated by the microRNA156 and its targets, the transcription factors SQUAMOSA promoter-binding-protein (SPLs) in sugarcane branching/tillering. We identified six members of the SPL family that were further classified into four subfamilies, based upon phylogenetic analyses. One family member, SsSPL1, is an orthologue of rice SPL14 and *Arabidopsis* SPL9 and -15. In both dicots and monocots, these SPLs are key regulators of the plant shoot architecture. Therefore, we monitored the expression patterns of SsmiR156 e SsSPL1 in distinct sugarcane tissues/organs. Our observations suggest that miR156 regulates posttranscriptionally SsSPL1 mainly in leaf tissues. We generated transgenic sugarcane plants overexpressing the monocot-specific sugarcane miR156 precursor SsMIR156b/c via biolistic method. This precursor is thought to be important for the evolution of grass shoot architecture. Based on previous data from maize, the overexpression of this miRNA precursor promotes higher branching/tillering and leaf tissues containing less lignin. Although we observed higher accumulation of mature SsmiR156b/c in leaf tissues of some transgenic plants as compared with tissues from non-transgenic plants, we could not detect any significant changes in their vegetative architecture. We are currently reanalyzing such plants and investigating the possible causes of the lack of the expected phenotype of the sugarcane transgenic plants.

Keywords: Sugarcane; MicroRNAs; SPL transcription factors; Tillering; Genetic transformation

2.1 Introdução

A cana de açúcar é considerada a cultura mais eficiente na produção de bioenergia em regiões tropicais e subtropicais, característica que a destaca num contexto mundial. Atualmente existe uma necessidade crescente pela substituição de combustíveis de origem fóssil por aqueles de origem vegetal. O etanol produzido da

cana é derivado principalmente do caldo que contém sacarose. Entretanto, a produção de etanol de segunda geração a partir de material lignocelulósico também é uma alternativa, que embora ainda não seja considerada viável, grandes investimentos estão sendo realizados para aperfeiçoar o seu processo produtivo.

Um crescente número de pesquisas com o objetivo de desenvolver mecanismos para aumentar a eficiência das culturas na produção de bioneregia está sendo realizado por vários grupos. O aumento da quantidade de biomassa produzida por unidade de área, que possa ser usada na obtenção de bioenergia, é uma das estratégias de maior consideração.

A produção de biomassa de uma planta está relacionada com sua arquitetura, que, por sua vez, é determinada geneticamente e em resposta a condições ambientais (LEYSER, 2009). Atualmente, complexas redes de regulação que incluem modificações na expressão gênica e alteração na produção e percepção de fitohormônios durante o desenvolvimento estão sendo associadas à determinação da arquitetura vegetal. Dentro as redes de regulação, microRNAs (miRNAs) são fatores importantes que possivelmente integram a percepção de fitohormônios, condições ambientais e expressão gênica. MiRNAs são uma classe de pequenos RNAs não codantes de 20-22 nucleotídeos codificados por genes *MIR* que se encontram amplamente distribuídos no genoma e regulam a expressão de seus genes alvo atuando principalmente ao nível pós-transcricional, por meio de interações RNA-RNA (HA et al., 2008).

Interessantemente, a superexpressão em *Arabidopsis* do miRNA156 que regula a expressão de membros da família de fatores de transcrição do tipo SQUAMOSA (SQUA) promoter-binding-protein (SPL), a qual é específica de plantas, promove severa redução na dominância apical, levando a uma maior produção de ramos laterais. O peso seco de plantas transgênicas superexpressando o miR156 é quatro vezes maior que das plantas selvagens, devido ao aumento substancial no número total de folhas, o que, conseqüentemente, leva ao aumento na biomassa. Fenótipo similar é observado em milho, arroz e tomateiro (XIE, WU, XIONG, 2006; CHUCK et al., 2007, SILVA et al., dados não publicados), demonstrando que o controle da brotação lateral via miRNA156/SPL é conservado em monocots e eudicots. Embora seja evidente o papel dessa via na formação de ramos axilares, até o momento não há estudos elucidando

quais vias genéticas e regulatórias de brotação lateral são alteradas em resposta a expressão ectópica do miRNA156. Recentemente nosso grupo de pesquisa identificou um precursor do miRNA156 em cana de açúcar (*SsMIR156b/c*) caracterizado por formar duas estruturas do tipo *harpin* na mesma molécula (Figura 4; ZANCA et al., 2010). Um melhor entendimento da via miR156/SPL em cana de açúcar poderá ser útil em programas de melhoramento, visando a obtenção de cultivares com aumento na produção de biomassa que possa ser utilizada na produção de biocombustíveis.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos: (i) identificar os possíveis alvos do miRNA156 em banco de dados de ESTs de cana-de-açúcar, (ii) monitorar o padrão de expressão do miRNA156 e genes-alvo em diferentes órgãos vegetais de cana-de-açúcar e (iii) gerar plantas transgênicas superexpressando o microRNA em questão com o intuito de obter-se plantas com aumento de biomassa e futuramente estudar-se vias regulatórias afetadas pelo miR156 em cana de açúcar.

Figura 4 – Representações das estruturas secundárias dos precursores *SsMIR156b/c*, geradas utilizando-se o algoritmo mFOLD. As linhas apontadas pelas setas indicam a sequência dos miR156 maduros

2.2 Material e métodos

Os experimentos e demais atividades referentes ao presente trabalho foram desenvolvidas no laboratório de Biologia Molecular e genômica, CEBTEC, do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

2.2.1 Predição *in silico* de potenciais genes-alvos do miRNA156 em cana de açúcar (*Saccharum spp*)

Baseado no fato de que miRNAs apresentam vasta complementaridade com o mRNA-alvo nas diferentes espécies vegetais (ZHANG et al., 2007), foi usada a sequência madura do miR156b/c de cana de açúcar (SsmiR156b/c) previamente identificada por nosso grupo de pesquisa (anexo A, ZANCA et al., 2010), para realizar a busca de seus potenciais alvos por meio de ferramenta computacional disponível em nosso banco de miRNAs de cana de açúcar (<http://sysbiol.cbmeg.unicamp.br/SCmiRNA>; ZANCA et al., 2010).

Para minimizar o número de falsos positivos, a sequência do SsmiR156b/c de 21-nt foi dividida em três blocos: os primeiros oito nucleotídeos da extremidade 5' foram considerados como o Bloco 1; os seguintes três nucleotídeos como Bloco 2, e os restantes dez nucleotídeos como Bloco 3. Para cada bloco, um número máximo de *mismatches* ou não pareamentos foi permitido: dois para o Bloco 1, zero para o Bloco 2 e até três para o Bloco 3. Tais restrições na busca de potenciais genes-alvo foram adotadas baseadas em dados experimentais apresentados em literatura pertinente (SCHWAB et al., 2005). As sequências que passaram por esses critérios foram analisadas em uma nova filtragem computacional: os *mismatches* entre o SsmiRNA156b/c e o potencial mRNA-alvo receberam “penalidades”. Para um pareamento G:U, algo comum entre miRNA e seu alvo (JONES-RHOADES; BARTEL; BARTEL, 2006), o *duplex* gerado foi penalizado em 0,5 pontos. Para os demais tipos de *mismatches*, a penalidade passou para 1,0 ponto. Em caso de um *gap* (ou uma inserção ou deleção), a penalidade foi de 1,5 pontos. Sequências com uma soma de penalidades $\leq 3,5$ foram consideradas como potenciais mRNA -alvo para o SsmiRNA156b/c. Posteriormente, sequências altamente relacionadas foram analisadas entre elas, usando o programa BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sequências com $\geq 95\%$ de identidade em nível de nucleotídeos foram consideradas como um mesmo mRNA.

2.2.2 Análise Filogenética dos mRNAs-alvo do SsmiRNA156b/c

Seqüências de nucleotídeos dos genes selecionados foram traduzidas para aminoácidos usando o software Expasy (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>) ou pelo *ORF Finder* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>). Subseqüentemente, domínios conservados das seqüências foram identificados por meio do software CD search (MARCHLER-BAUER et al., 2009) (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). O programa ClustalW (Thompson et al., 1994) foi utilizado para realizar o alinhamento dos domínios conservados das seqüências de cana de açúcar e de outras espécies (arroz e arabidopsis) nas quais os genes alvo do miR156 foram previamente descritos (RHOADES et al., 2002; XIE, WU, XIONG, 2006). A árvore filogenética foi gerada com o auxílio do programa MEGA 4.1 (TAMURA et al., 2007), usando o método de inferência “Neighbor-Joining” (SAITOU; NEI, 1987). O grau de confiabilidade da árvore foi avaliado pelo teste probabilístico *bootstrap* (SITNIKOVA; RZHETSKY; NEI, 1995), originado a partir de 1000 repetições.

Seqüências de aminoácido dos genes alvo do miR156 em arroz e arabidopsis foram obtidas do banco de dados público NCBI (National Center for Biotechnology information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e TAIR (The Arabidopsis Information Resource, version 7.0 - <http://www.arabidopsis.org/>).

2.2.3 Material Vegetal

O material vegetal da cultivar de cana de açúcar RB835486 foi cedido pela Universidade Federal de São Carlo (UFSCar), oriundo da Unidade Experimental de Araras. A cultivar RB835486 é caracterizada pela alta produtividade agrícola, riqueza no teor de sacarose e ampla adaptabilidade às condições de cultivo.

Para atividades referentes ao monitoramento da expressão gênica em diferentes tecidos/órgãos, coletou-se lâmina foliar e bainha foliar de plantas com três semanas de idade, crescidas em casa de vegetação, enquanto que *leaf-roll* (primórdios foliares e meristema apical) e gemas laterais foram coletadas de plantas adultas (aproximadamente seis meses de idade). Como fonte de explantes para obtenção de tecido alvo usado na transformação genética de cana de açúcar, utilizou-se material de plantas com idade em torno de oito a 10 meses.

2.2.4 Isolamento e quantificação de ácidos nucleicos

Em várias fases desta pesquisa, foi requerido o isolamento de DNA genômico e RNA total. Quando coletado, o material vegetal usado na extração de ácidos nucleicos foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C, para posterior utilização.

2.2.4.1 Isolamento e quantificação de DNA genômico

Material vegetal foi macerado em almofariz com nitrogênio líquido até se tornar um pó fino. Posteriormente, o DNA genômico foi isolado utilizando-se o método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987). A quantidade e qualidade do DNA das amostras foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com 0,001% (v/v) de brometo de etídio, em tampão de corrida TAE 1x (40mM Tris-acetato; 1mM EDTA) com tensão constante de 100V. Como padrão de referência na quantificação, utilizou-se alíquotas em concentrações diferentes do plasmídeo pGEM não digerido (50, 100, e 200ng/μl).

2.2.4.2 Isolamento, tratamento com *DNaseI* e quantificação de RNA total

O isolamento de RNA total das diferentes amostras foi feito seguindo-se as recomendações do fabricante do reagente TRizol (Invitrogen). Aproximadamente 250 mg do material congelado foi macerado em almofariz para extração do RNA total.

Após a extração do RNA total, tratou-se as amostras com 1μl de *DNaseI Amplification Grade* (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante para remoção total de DNA genômico das amostras. Para evitar possíveis interferências residuais da *DNaseI* no processo de síntese de cDNA, as amostras de RNA foram purificadas por re-extração com TRizol, mas usando somente ¼ do volume dos reagentes. Em seguida, a integridade das amostras de RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1.5% corado com 0,001% (v/v) de brometo de etídio, em tampão de corrida TAE 1x (40mM Tris-acetato; 1mM EDTA) com tensão constante de 130V. A concentração e pureza do RNA foi avaliada por espectrofotometria de absorção, utilizando o equipamento Thermo NanoDrop 2000 (Uniscience). Finalmente, a ausência de DNA genômico nas amostras de RNA total foi confirmada por meio da realização de reação de PCR usando iniciadores específicos de um gene endógeno.

2.2.5 Síntese de cDNA via *pulsed stem-loop* RT-PCR

RNA total, tratados com enzima *DNaseI* tal como descrito anteriormente, foi utilizado para a síntese da primeira fita de cDNA por *Pulsed* RT-PCR (Figura 5, VARKONYI-GASIC et al., 2007). Juntamente com o iniciador específico para cada miRNA (*iniciador RT*), também foi adicionado oligodT para posterior normalização da quantidade de cDNA utilizado em cada reação de PCR.

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir de 1,5 µg do RNA total purificado usando o Kit *Improm-II Reverse Transcriptase* (Promega). Ao RNA foi adicionado 1µl de dNTP 10mM, 1µl de oligodT (500ng/ul), juntamente com o *iniciador RT* para o SsmiRNA156 maduro (Anexo B). As amostras foram incubadas a 70°C por 10 minutos para denaturação das estruturas secundárias e depois incubadas a 5°C por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 5µl de *Improm-II 5x Reaction Buffer*, 2,4µl de MgC₂, 0,6µl de *RNase out* e 1µl da enzima *Improm-II Reverse Transcriptase*.

As reações foram incubadas em termociclador a 16°C por 30 minutos, seguidas por transcrição reversa de 60 ciclos de 30°C por 30 segundos, 42°C por 30 segundos e 50°C por 1 segundo. Para inativação da enzima *Improm-II Reverse Transcriptase*, a reação foi incubada a 70°C durante 15 minutos. Subseqüentemente, as reações foram armazenadas a -20°C.

Figura 5 - Esquema do *pulsed stem-loop* RT-PCR retirado de (Varkonyi-Gasic, WU et al., 2007). Iniciadores específicos *stem-loop* anelam na porção 3' das moléculas de miRNA maduro, iniciando sua transcrição reversa. Posteriormente, o miRNA maduro é amplificado utilizando-se iniciador direto específico e um iniciador reverso universal

2.2.6 Perfil espacial da expressão do SsmiR156 maduro e um de seus genes alvos em cana de açúcar

A expressão do miR156 maduro e um de seus genes alvo foi monitorada em lâmina foliar, bainha foliar, gema lateral e *leaf-roll* de cana de açúcar cv. RB835486, usando a técnica de RT-PCR semiquantitativo. Duas amostras biológicas com um *pool* de quatro plantas para cada tecido/órgão foram avaliadas.

Iniciadores específicos foram desenhados (Anexos C e D) baseados nas seqüências previamente identificadas, levando em consideração características como T_m (Temperatura de “melting”), a formação de dímeros (“cross-dimers” and “self-dimers”) e a formação de estruturas secundárias (“harpins”), analisadas no software Beacon designer (<http://www.premierbiosoft.com>). No caso do gene alvo, os iniciadores foram localizados flanqueando o sitio de reconhecimento do miR156 (Figura 6). Desta forma, garantiu-se que apenas transcritos não clivados fossem amplificados.

Figura 6 - Esquema representativo da posição dos iniciadores desenhados para amplificar o gene alvo

Previamente à análise de expressão, a quantidade de cDNA utilizada em cada reação de PCR foi normalizada utilizando-se iniciadores específicos para o gene codificador de *actina* e *GAPDH* em cana de açúcar (Anexo D) (*Ssactina*, número de acesso AY742219, *SsGAPDH*, número de acesso TC119999), os quais têm sido testados como genes controle para análises de expressão em cana de açúcar (ISKANDAR et al., 2004).

Reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µl, contendo cDNA das amostras ; 2,5µl de tampão Taq KCl 10x; 1,5µl de MgCl₂ 25mM; 0,625µl de dNTPMix10mM; 1µl de cada iniciador a 10µM e 1.5U de *Taq DNA Polymerase*. As reações foram conduzidas a 94°C/2 minutos, seguidos de “n” ciclos de 94°C/20 segundos, 58°C/30 segundos, 72°C/40 segundos, finalizando com uma extensão final a 72°C/10 minutos. A reação de PCR RT negativo (RT-), ou seja, sem cDNA, foi realizada para garantir a ausência de contaminação com DNA genômico. O produto da PCR foi visualizado por meio de eletroforese em gel de agarose 2,5%, em tampão de corrida TAE 1X, sob tensão constante de 100V.

2.2.7 Construção do vetor de transformação genética com o gene *SsmiR156b/c*

Em trabalhos prévios de nosso grupo de pesquisa, foi caracterizada a sequência do precursor do gene *SsMIR156b/c* de cana de açúcar no banco de dados do *TIGR*

Gene Index (ZANCA et al., 2010). Esta sequência foi usada como base para o desenho de iniciadores específicos (Anexo D) para amplificar o gene *SsMIR156b/c* a partir de DNA genômico da cultivar RB835486. Para clonagem do inserto em vetor de transformação, foi adicionado nas extremidades 5' dos iniciadores a sequência "GGATCC" referente ao sítio de restrição da enzima BamHI. Na reação de PCR utilizou-se a enzima DNA polimerase *Taq Platinum* (Invitrogen).

Os fragmentos amplificados (0,8Kb) a partir do DNA genômico da cultivar RB8354 foram visualizados em gel de agarose 1%, removidos e subsequentemente purificados usando o kit *DNA Gel Extraction* (Fermentas), procedendo conforme as instruções do fabricante. O DNA purificado foi clonado no vetor pCR®4-TOPO® (Invitrogen), resultando no plasmídeo pFA1. As ligações foram transformadas em células de *E. coli* da cepa *DH5α*. Depois, 50 µL da transformação foram inoculados em placas de meio sólido LB com 100 µg/mL de canamicina, contendo X-gal e IPTG. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas. As colônias brancas resultantes foram inoculadas em meio líquido, e após crescimento por 16 horas a 37°C, os inóculos foram usados para extração de DNA plasmidial. Aproximadamente 300 ng de DNA foram analisados usando o seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems) com *ET Dye-terminators*, acompanhando os protocolos estabelecidos no CEBTEC. A sequência gerada foi comparada com a sequência previamente identificada por meio de uma análise de similaridade usando a ferramenta BLASTn/NCBI, comprovando a identidade do precursor do *SsMIR156b/c* e a presença dos dois *stem-loops* característicos (Figura 1).

Após comprovação da identidade do fragmento referente ao *SsMIR156b/c*, este foi retirado do pFA1 utilizando-se a enzima *Bam*HI e clonado no vetor pAHC17, previamente digerido com a mesma enzima. O vetor pAHC17 é composto pelo promotor do gene *ubiquitina-1* de milho (*Ubi-1*), intron *Ubi-1*, sítio múltiplo de clonagem e o terminador da *nopalina sintase* (*NOS*) (CHRISTENSEN; SHARROCK; QUAIL, 1992). Como resultado foi criado o vetor final para transformação genética de cana denominado pFA156 (Figura 7). Finalmente com o intuito de certificar a qualidade do vetor de transformação (pFA156), este foi seqüenciado e analisado como descrito anteriormente para o vetor pFA1.

Figura 7 – Representação esquemática do plasmídeo pFA156, contendo o gene *SsMIR156b/c* sob o controle do promotor do gene *Ubi-1* de milho. B, *BamHI*

2.2.8 Obtenção de tecido alvo para transformação de cana de açúcar

Para transformação genética de cana, calos embriogênicos foram usados como tecidos alvos. Estes foram obtidos a partir de palmitos de plantas em torno de oito a dez meses de idade. O palmito é a região que compreende os primórdios foliares, ou *leaf-roll*, na qual estão presentes tecidos de bainha de folhas imaturas e o meristema apical. O procedimento de obtenção, preparo e desinfestação dos palmitos foi feita seguindo os procedimentos descritos por (BARBOSA, 2010; JESUS, 2010; PICELLI, 2010).

Para obtenção de calos embriogênicos, seções transversais dos palmitos, ou discos foliares, da cultivar RB835486, foram colocados em placas de Petri (9x1,5cm), com a face distal do explante em contato com o meio de cultura (Lakshmanan, Geijskes *et al.*, 2006). O meio de cultura empregado foi o MS3C semi-sólido, baseado na concentração de sais e vitaminas do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g/l de sacarose, 3 mg/L de ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4D), 50ml/L de água de coco (marca Kerococo), 150mg/L de ácido cítrico, com pH ajustado para 5.8 e solidificado com 2,3 g/l de Phytigel (Sigma Aldrich). Os explantes foram colocados em câmara de crescimento, na ausência de luz e sob temperatura constante de 27°C.

A cada três ou quatro semanas, os calos foram repicados e transferidos para meio fresco. Células de calos embriogênicos foram selecionadas em cada etapa de subcultivo. Após o quarto subcultivo (R4), o calo embriogênico foi considerado apto para transformação genética (PASSARIN, 2009; BARBOSA, 2010; PICELLI, 2010).

2.2.9 Transformação genética de cana de açúcar

Para transformação de cana de açúcar, foi utilizado o procedimento de co-transformação genética usando o vetor pFA156 que contém o gene de interesse, juntamente com o vetor pH9 que possui o gene marcador de seleção *npt-II*, cuja expressão é dirigida pelo promotor *Ubi-1* e o terminador *T-nos* (Figura 8). Os vetores foram inseridos no tecido alvo pelo processo de biolística, seguindo os procedimentos adotados por Kumar e Daniell, 2004. A tecnologia de co-transformação permite a introdução de múltiplos genes de interesse em um único passo, facilitando o processo de transformação via biolística (FRANÇOIS, BROEKAERT, CAMMUE, 2002).

Figura 8 - Esquema representativo do plasmídeo pH9 que contém o cassete de expressão do gene *neo* (neomicina fosfotransferase), sob o controle do promotor da ubiquitina do milho (*Ubi-1*) e o terminador da nopalina sintase (*T-nos*). As setas indicam a posição dos primers *neo* (*Forward*) e *neo* (*Reverse*). Sítios e restrição: B, *Bam*HI; Bg, *Bgl*II; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; P, *Pst*I; Sa, *Sall*; Sp, *Sph*I; T, *Tth*I; X, *Xba*I. Retirado de Picelli (2010)

Quatro horas antes de serem bombardeados, os calos embriogênicos R4, foram distribuídos na parte central de uma placa de Petri formando um círculo de aproximadamente 3,5cm de diâmetro e transferidos para meio osmótico (meio MS₃C acrescentado de 73g/L de manitol, 73g/L de sorbitol e 150 mg/L de ácido cítrico) sobre papel filtro (6x6cm) estéril (Figura 9). O meio osmótico causa plasmólise parcial das células alvo, aumentando a eficiência do processo de transformação via biolística (VAIN; MCMULLEN; FINER, 1993).

Figura 9 - Calos embriogênicos após 120 dias de cultivo, utilizados para transformação genética via biolística. Dentro do Círculo se encontram os calos embriogênicos

Para o bombardeamento, utilizou-se micropartículas de tungstênio M10 de 0.8 μ m (GTE Sylvania Chemicals/Metals) cobertas com o DNA dos vetores, numa concentração de 4 μ g de DNA (2 μ g do pFA156 e 2 μ g pHA9) por mg de tungstênio, suspensos em 12 μ l de etanol absoluto gelado. Cinco microlitros da suspensão foram depositados em membranas carregadoras, para posteriormente serem disparados em cada placa com o tecido alvo. As partículas foram bombardeadas utilizando-se o acelerador de partículas modelo PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System (Bio-Rad), com pressão de disparo ajustada em 1100 psi. O preparo das partículas e precipitação do DNA, foi feita segundo os protocolos descritos por Passarin (2009) – Picelli (2010), o quais são baseados no protocolo descrito por Rech e Aragão (1998).

A verificação da qualidade do preparo dos microprojéteis (partículas de tungstênio cobertas com DNA) e o correto funcionamento do bombardeador foram realizados conforme descrito anteriormente (PICELLI, 2010).

2.2.10 Regeneração de plantas e seleção de transformantes

Após bombardeamento, os calos foram mantidos em meio osmótico por mais quatro horas e em seguida foram transferidos para meio MS₃C suplementado com 250mg/L de ceftazidima, antibiótico utilizado para reduzir o risco de contaminação por bactérias logo após os disparos (BIRCH, 1997), e colocados em câmara de crescimento

na ausência de luz e sob temperatura constante de 27°C por uma semana. Esse período permite que os calos possam se recuperar do estresse induzido pelo meio osmótico e o processo de bombardeamento. Posteriormente, estes foram transferidos para meio MS₃C suplementado com 20 mg/L de geneticina (agente seletivo FALCO, 1998) e mantidos nas mesmas condições de crescimento por três semanas.

Finalmente, os calos foram transferidos para meio de regeneração seletivo (composto por sais MS suplementados com 30g L⁻¹ de sacarose e 30 mg L⁻¹ de geneticina) e mantidos em fotoperíodo de 16h de luz e temperatura de 27 °C, transferido-os para meio fresco a cada quatro semanas. O início da formação de brotos foi verificado entre 21-26 dias após ser colocados neste meio. Plantas regeneradas foram isoladas e mantidas em meio seletivo até serem avaliadas por técnicas moleculares.

2.2.11 Confirmação de eventos de transformação

Plantas regeneradas em meio seletivo foram genotipadas em relação a presença ou ausência do transgene *pUBI::SsMIR156b/c* por PCR. Primeiramente, o DNA genômico foi extraído (como descrito no item 2.2.4.1) e sua qualidade foi testada via PCR usando iniciadores do gene endógeno *SsRPL35-4* (Anexo 4), o qual é responsável pela síntese da proteína L35-4 que compõe a subunidade ribossomal 60S (CALSA; FIGUEIRA, 2007). Subseqüentemente, reações de PCR foram realizadas visando amplificar o transgene *pUBI::SsMIR156b/c*, utilizando-se para tal iniciador direto que anela na região do intron do gene *Ubi-1* de milho, enquanto que o iniciador reverso foi posicionado na região do precursor do *SsMIR156b/c*. Dois iniciadores reversos foram desenhados (Anexo 4). Somente plantas nas quais foi possível amplificar o transgene *pUBI::SsMIR156b/c* usando o iniciador direto com as duas combinações de iniciadores reversos foram consideradas como plantas transformadas com o vetor pFA156. A inserção do cassete marcador seletivo do vetor pHA9 também foi testada em algumas plantas, usando iniciadores que anelam numa região do promotor *Ubi-1* e em região do gene *npt-II* (Anexo D).

Reações de PCR foram realizadas em volume final de 25 µl, contendo 80ng de DNA das amostras; 2,5µl de tampão Taq KCl 10x; 1,5µl de MgCl₂ 25mM; 0,625µl de

dNTPMix 10mM; 1µ de cada primer 10µm e 1U de *Taq DNA Polymerase*. As reações foram conduzidas em termociclador a 94°C/3 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94°C/30 segundos, 58°C/30 segundos, 72°C/50 segundos, finalizando com uma extensão final a 72°C/10 minutos. O produto da PCR foi visualizado por meio de eletroforese em gel de agarose 1.5%, em tampão de corrida TAE 1X, sob tensão constante de 100V.

Fragmentos de DNA amplificados no tamanho correto foram purificados do gel usando o kit *DNA Gel Extraction* (Fermentas) e confirmação de sua identidade foi feita através de seqüenciamento com ET *Dye-terminators* (sequenciador ABI 3100 -Applied Biosystems). A seqüência gerada foi avaliada em relação a sua identidade com a seqüência do transgene *pUBI::SsMIR156b/c* por meio de BLASTn/NCBI.

2.2.12 Análise de acúmulo de transcritos do SsmiR156 maduro em plantas transgênicas

Plantas confirmadas como portadoras do transgene *pUBI::SsMIR156b/c* foram avaliadas em relação à expressão do SsmiR156 maduro por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Utilizou-se folhas de plantas *in vitro* como material vegetal para extração de RNA total e posterior síntese de cDNA pelo método *pulsed* RT-PCR (ver item 2.2.5). Como controles, foram usados plantas selvagens crescidas *in vitro* e plantas transformadas unicamente com o gene de seleção *nptII*.

Para análise da expressão do SsmiR156 via RT-qPCR nas plantas transformadas, foram usados os mesmos iniciadores utilizados na elaboração do perfil espacial da expressão do miR156 via RT-PCR semiquantitativo (ver item 2.2.6).

As reações de amplificação RT-qPCR foram realizadas em volume final de 25 µl, usando 5µl de cDNA na diluição 1:80 (v:v), 0,3µl de cada iniciador na concentração 10mM, 12,5µl de platinum sybr green qPCR (invitrogen) e 6,9µl de água milli-Q. A amplificação foi conduzida em termociclador *Applied Biosystems 7500/7500 fast*. O programa utilizado foi: 50°C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos e 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos, com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão. Após a termociclagem, curvas de dissociação foram determinadas para cada produto amplificado (curva de *melting*). Todas as reações foram feitas em duplicatas, incluindo uma amostra controle (NTC) contendo somente

água milliQ. A eficiência de amplificação de cada par de iniciador foi determinada por curva padrão utilizando-se diluições seriadas de cDNA, sendo calculada pela equação: $E = [10^{(1/\text{pende})}] - 1$. Para cada gene o valor de E ficou entre 0,9 e 1,1.

O método escolhido para análise da expressão gênica é considerado relativo, uma vez que a transcrição do gene de interesse não foi expressa em número absoluto de transcritos da amostra, e sim em relação a quantidade relativa de transcritos de outro gene cuja expressão é tida como constante, denominado gene normalizador (SERENO, 2009). Com o intuito de verificar qual seria o melhor genenormalizador, quatro genes candidatos foram avaliados: *GAPDH*, *RPL35*, *ribossomal 25S* e β -*actina* (Anexo 4), submetendo cada um deles a ciclos de amplificações quantitativas, usando cDNA gerado a partir de um pool de amostras de plantas transformadas e não transformadas com o transgene *pUBI::SsMIR156b/c* (dados não mostrados). O gene *ribossomal 25S* foi escolhido como gene normalizador.

O cálculo de expressão relativa foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ descrito por Livak e Schmittgen, 2001. Este permite a quantificação relativa, baseado na medição do ciclo em que é atingido o limiar da fase exponencial da reação de PCR, denominado Cycle Threshold (CT). Os valores de CT são determinados pela identificação do ciclo no qual a emissão da intensidade do marcador fluorescente esta acima de sinais inespecíficos.

$$\Delta CT = CT \text{ gene de interesse} - CT \text{ gene normalizador}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ amostra controle} - \Delta CT \text{ amostra planta transgênica}$$

$$\text{Exp. Real.} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Identificação de genes alvo do SsmiR156 e sua análise filogenética.

Inicialmente, a busca de genes alvo do SsmiRNA156 permitiu identificar 19 SoGIs que apresentam sítio de regulação para este miRNA. Posterior análise de redundância reduziu esse número para 11 seqüências. O elevado número inicial deve-se provavelmente à redundância do banco de ESTs de cana de açúcar, visto que algumas vezes a clusterização não agrupa corretamente seqüências de um mesmo gene, seja por falta de qualidade mínima de seqüência ou pela presença de *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) e/ou *indels* (inserções/deleções), uma vez que cana de açúcar é altamente poliplóide e possui vários alelos para um mesmo gene.

Em seguida, as seqüências de nucleotídeos foram traduzidas para aminoácidos e utilizadas para caracterizar *in silico* seus domínios conservados do tipo SBP, o qual é específico de plantas (KLEIN; SAEDLER; HUIJSER, 1996). O domínio SBP apresenta um comprimento de 79 aminoácidos, caracterizado pela presença de dois separados sítios de ligação do tipo *Zinc finger*, montados como Cys-Cys-His-Cys e Cys-Cys-Cys-His (YAMASAKI et al., 2004).

Para cinco das 11 seqüências não foi possível identificar nenhum domínio conservado, sendo portanto descartadas de análises posteriores. Identificou-se nas demais seqüências o domínio da família de fatores de transcrição SQUAMOSA *Promoter-Bindig Protein-Like* (SPL). Genes *SPL* têm sido mostrados como sendo reguladores importantes em diferentes aspectos durante o crescimento e desenvolvimento das plantas. A regulação pós-transcricional via miRNA156 de alguns membros desta família gênica parece ser conservado em varias plantas (GUO et al., 2008). Em arroz, 11 dos 19 genes *SPL* são regulados pelo miR156 (XIE et al., 2006). As seis seqüências encontradas em cana dos genes *SPL* contendo sítio de reconhecimento do miR156 e domínio conservado SBP foram identificadas como SsSPL1-6 (Tabela 2.1).

Tabela 1 – Potenciais alvos do *SsmiRNA156* encontrados em cana de açúcar

Identificação Gene	Código de acesso	Seqüência complementar de RNA
SsmiRNA156	TC110664	3` ACA CGA GUG AGA GAA GAC AGU 5´
SsSPL1	CA072223, CA228340, TC110345	5` uGU GCU CUC UCU CUU CUG UCA 3´
SsSPL2	TC96571, TC76232, CA188863	5` cGU GCU CUC UCU CUU CUG UCA 3´
SsSPL3	TC112606	5` gGU GCU CUC UCU CUU CUG UCA 3´
SsSPL4*	TC87521	5` cGU GCU CUC UCU CUU CUG UCA 3´
SsSPL5	TC98485	5` cGU GCU CUC UCU CUU CUG UCA 3´
SsSPL6	CA231663	5` uGU GCU CUC UCU CUU CUG UCA 3´

Para cada gene, a seqüência de nucleotídeos complementar ao miRNA foi dividida nos códons correspondentes ao quadro de leitura. Seqüência Reversa complementar do SsmiRNA156 é mostrada para cada nucleotídeo da seqüência alvo, mismatches são mostrados em letra minúscula. A seqüência complementar entre o SsmiR156 e SsSPL4 (indicada por um asterisco) não é encontrada na região codificante.

Após ter sido identificada a posição dos domínios conservados para as SsSPL1-6, foi feito o alinhamento de aminoácidos dos domínios SBP de nove genes SPL de arabidopsis e 11 de arroz, sendo. Com base neste alinhamento, foi construída árvore filogenética em que as seis proteínas SsSPLs foram classificadas em quatro grupos com seus possíveis genes ortólogos (Figura 10). Árvore filogenética similar entre genes SPLs de arroz e arabidopsis foi obtida recentemente, agrupando de forma similar os genes membros desta família (GUO et al., 2008). Tal fato corrobora com a topologia da árvore filogenética gerada neste trabalho, embora os autores tenham obtido valores

maiores de *bootstrap* (GUO et al., 2008). Os baixos valores de *bootstrap* obtidos em nossas análises podem ser devido principalmente ao fato de que foram utilizadas seqüências parciais dos domínios SBP das espécies avaliadas. Esta estratégia foi necessária porque algumas das seqüências de ESTs de cana de açúcar estão incompletas na região 5', onde está localizado o domínio SBP.

Figura 10 - Árvore filogenética das proteínas SPL reguladas pelo miR156 de cana de açúcar (Ss), arabidopsis (At) e arroz (Os). Todos os valores de *bootstrap* em cada nó foram gerados a partir de 1000 réplicas. As seqüências de SPL de cana de açúcar se encontram sublinhadas em vermelho

2.3.2 Perfil espacial da expressão do miR156 maduro e um de seus genes alvo em cana de açúcar

O gene *SsSPL1* foi escolhido como gene candidato para monitorar seu perfil de expressão nos diferentes tecidos e órgãos de cana de açúcar, junto ao miR156. Sua seleção foi baseada no resultado da análise filogenética (Figura 10), que indica que o gene *SsSPL1* possivelmente é ortólogo aos genes *OsSPL14* e *AtSPL9* e *AtSPL15*, os quais apresentam funções associadas com a arquitetura vegetal (JIAO et al., 2010; SCHWARZ et al., 2008).

Na figura 11 é apresentado o perfil de expressão do *SsmiR156* e seu gene alvo *SsSPL1* em cana de açúcar. Como esperado em órgãos/tecidos em que o *SsmiR156* acumula em baixos níveis, ocorre aumento no acúmulo de transcritos intactos do gene *SsSPL1*, confirmando sua regulação pós-transcricional. A expressão do gene *SsSPL1* foi maior em *leaf roll* (primórdios foliares e ápice vegetativo) e em gema lateral, enquanto que o acúmulo do *SsmiR156* foi maior na bainha foliar e lâmina foliar. Estes resultados apresentam similaridade com o padrão de expressão reportado para o gene *OsSPL14* (ortólogo ao *SsSPL1*) e *OsmiRNA156* em arroz, sendo *OsSPL14* altamente expresso no ápice vegetativo e pouco expresso na lâmina foliar, enquanto que a expressão do *OsmiR156* apresenta o padrão oposto; entretanto os autores também reportaram que a expressão do *OsmiR156* e *OsSPL14* foi baixa na bainha foliar (JIAO et al., 2010), fato que não é observado em cana de açúcar onde a expressão do *SsSPL1* é baixa, mas o acúmulo do *SsmiR156* neste tecido foi alta.

Figura 11 - Acúmulo de transcritos do miR156 maduro e seu alvo *SsSPL1* em tecidos/órgãos de cana de açúcar. Controle negativo: reações de RT-PCR sem a enzima RT. (RT-) Controle negativo: reações de RT-PCR sem a enzima RT (RT-). O gene da *Ssactina* e *SsGAPDH* foram utilizados como controle interno de amplificação

Neste experimento foi observado que a maior expressão do *SsSPL1* foi encontrada no *leaf roll* e na gema axilar, os quais contém ápices meristemáticos, embora na gema este se encontre em estado de dormência. Este resultado pode estar associado com uma possível função do gene *SsSPL1* na formação de órgão laterais gerados a partir dos meristemas vegetativos em cana de açúcar. Esta observação é baseada no fato de que possíveis ortólogos do *SsSPL1* em arroz e arabidopsis (Figura 10), são expressos preferivelmente nos ápices vegetativos e que qualquer alteração no seu normal padrão de expressão pode mudar o número de brotações laterais (JIAO et al., 2010).

Jiao et al. (2010) reportaram que plantas de arroz com elevada expressão de *OsSPL14* apresentam fenótipo com menor número de perfilhos; este maior acúmulo de transcritos de *OsSPL14* é devido à mutação no sítio de reconhecimento do *OsmiR156* o que afeta a clivagem do mRNA e consequentemente sua regulação pós-transcricional (JIAO et al., 2010). Na mesma pesquisa foi reportado que plantas com menor expressão de *OsSPL14* apresentam fenótipos opostos ao descrito anteriormente, com maior número de perfilhos, redução na altura da planta e menor diâmetro dos caules.

Em arabidopsis foi encontrado que plantas com reduzida expressão dos genes *AtSPL9* e *AtSPL15*, os quais apresentam função redundante (ortólogos de *SsSPL1* e *OsSPL14*), apresentam fenótipos com maior número de brotações laterais e plantas de menor tamanho (SCHWARZ et al., 2008; WANG et al., 2008), sugerindo que a função destes genes na modulação da arquitetura vegetal é conservada tanto em eudicotiledôneas como monocotiledôneas. Recentemente foi mostrado que o gene *tasselsheath4* de milho, o qual também é um fator de transcrição do tipo *SPL* e alvo do *miR156*, regula o estabelecimento dos limites no meristema (CHUCK et al., 2010). Estes dados em conjunto evidenciam a importância da via *miR156/SPL* na regulação da brotação e formação de órgãos laterais.

Com base na função dos seus ortólogos em arroz e arabidopsis, é possível argumentar que o gene *SsSPL1* seria um bom candidato para ser utilizado em programas de melhoramento genético que visam a geração ou identificação de plantas com características desejáveis associadas à arquitetura da planta. Polimorfismos de nucleotídeo único ou SNP (*Single nucleotide polymorphisms*), associados à sequência complementar entre o *SsSPL1* e o *SsmiR156* poderiam ser utilizados em populações segregantes como marcadores de perfilhamento, já que mudanças nessa região podem tornar a *SsSPL1* insensível à regulação pós –transcricional pelo miRNA, mudando seu padrão normal de expressão e conseqüentemente a arquitetura da planta. Outros tipos de polimorfismos associados a fatores que mudem a expressão deste gene também poderiam ser utilizados.

2.3.3 Análise da sequência do precursor do *Ssmir156b/c*

Para construção do vetor foi escolhido o gene *SsMIR156b/c* (Figura 4) , o qual codifica um precursor que forma duas estruturas do tipo harpin, cada um dando origem a uma sequência madura do miRNA (*tandem*) (ZANCA et al., 2010), fato observado em seus homólogos de arroz, sorgo e milho (WANG et al., 2007). Até o momento, poucos exemplos de precursores policistrônicos foram descritos em espécies vegetais, sendo este fato comum em miRNAs de animais (JONES-RHOADES, BARTEL; BARTEL, 2006). Interessantemente precursores *MIR156b/c* apresentam uma extensa homologia entre suas seqüências, fato atípico entre precursores de miRNAs. Em geral,

precursores de miRNA são conservados somente nas regiões do miRNA maduro e sua região complementar (AXTELL; BOWMAN, 2008).

Baseado no exposto e com o objetivo de elucidar se o precursor *SsMIR156b/c* também é conservado, foi realizado inicialmente um alinhamento da sua sequência como os precursores de milho e sorgo, encontrando uma alta homologia entre as três espécies (Figura 12), o que sugere que estas espécies compartilham não somente conservação ao nível de genes codificadores de proteínas, mas também ao nível de regiões intergênicas, nas quais os genes *MIR* são encontrados. Em concordância com este resultado Zanca *et al.* (2010), reportaram que precursores de vários miRNAs de cana de açúcar são altamente similares com seus homólogos em sorgo ao nível de nucleotídeo e de sua estrutura secundária.

Figura 12 - Alinhamento do precursor do miRNAs miR156b/c de cana de açúcar (*Ss*), sorgo (*Sb*) e milho (*Corngrass1*). Linhas vermelhas representam o miRNA maduro

A alta homologia encontrada entre os precursores do *MIR156b/c* das três espécies, junto ao fato de que esse precursor foi reportado somente em monocotiledôneas, permite sugerir que este gene teve origem depois da divergência entre monocotiledôneas e eudicotiledôneas, mas antes da divergência dos cereais, sendo submetido a uma forte pressão de seleção durante a evolução das gramíneas (WANG *et al.*, 2007). Em milho, mudanças na expressão deste gene e de seus alvos foi um fator importante durante sua domesticação (CHUCK *et al.*, 2007). Tal observação é corroborada pelo fenótipo apresentado pelo mutante dominante *Corngrass1* (*Cg1*), a qual apresenta superexpressão do *MIR156b/c* no meristema e órgãos laterais. O

mutante *Cg1* apresenta um incremento no número de perfilhos com características juvenis durante a fase adulta, lembrando o fenótipo do ancestral do milho “*teosinte*” (CHUCK et al., 2007; DOEBLEY; STEC, 1991).

Portanto um possível aumento na expressão do *MIR156a/b* em cana de açúcar pode levar à fenótipos similares aos encontrados em milho, ideais para a produção de bicomcombustíveis a partir de celulose, pois além de produzir maior numero de brotações laterais e folhas (maior biomassa por unidade de área), os tecidos vegetais são menos lignificados. Esta última característica poderia facilitar a extração de celulose e sua posterior utilização na produção de etanol celulósico.

2.3.4 Transformação genética de cana de açúcar e seleção de transformantes

Após serem bombardeados com o vetor pFA156 e o vetor pHA9, que possui o gene marcador de seleção, os calos embriogênicos foram transferidos para meio de regeneração contendo geneticina como agente seletivo. Da totalidade de calos bombardeados, 36 plantas tolerantes a geneticina (eventos independentes) foram obtidas, das quais em 22 foi confirmada a integração do transgene *pUBI::SsMIR156b/c*, com auxílio da técnica de PCR. Embora a avaliação da integração do gene marcador de seleção não estivesse dentro dos objetivos deste trabalho, em dez plantas (cinco transformadas e cinco não transformadas com o transgene de interesse) foi também testado a integração do gene *npt-II*. Dentre essas, somente em uma planta não foi possível confirmar a presença do gene *npt-II*. Tal planta foi considerada como escape em vista de que a presença do transgene de interesse também não foi detectada.

Para a realização da genotipagem das plantas, inicialmente a qualidade do DNA foi testada para todas as plantas mediante amplificação do gene *SsRPL35-4* (Figura 13 A). Desta forma, foi descartada a possibilidade de que possíveis eventos positivos não fossem detectados por causa de problemas com a qualidade do DNA genômico extraído. Em seguida, as mesmas amostras de DNA genômico foram testadas quanto à integração do transgene *pUBI::SsMIR156b/c*, usando dois pares de iniciadores diferentes (Figura 13 A e B). O iniciador direto do *pUBI::SsMIR156b/c* foi posicionado na extremidade 3' do intron do gene *UBI* de milho, presente no vetor pFA156 (Figura 7), enquanto que os iniciadores reversos foram posicionados na extremidade 5' do

precursor *SsMIR156b/c*. O uso desses iniciadores em conjunto reduzem a possibilidade do precursor endógeno ter sido amplificado nas reações de PCR, evitando possíveis falsos positivos. Plantas em que o transgene foi amplificado usando os dois pares de iniciadores foram consideradas como transformantes positivos.

Figura 13 – Géis de PCR ilustrando a genotipagem de 12 plantas bombardeadas de cana de açúcar. **(A)** Amplicons do gene *SsRPL35-4* utilizado como controle de qualidade para o DNA genômico. **(B)** Amplicons do transgene *pUBI::SsMIR156b/c* gerados com primeiro par de iniciadores (Anexo 4). **(C)** Amplicons do transgene *pUBI::SsMIR156b/c* gerados com segundo par de iniciadores (Anexo 4). Amostras 1-3, 4 e 8-11 foram consideradas como eventos de transformação positivos para o *pUBI::SsMIR156b/c*. L: 1Kb plus DNA ladder. (C-) controle negativo: reação de PCR sem DNA. WT: planta in vitro não bombardeada e regenerada a partir de calos embriogênicos. (C+) controle positivo: reação de PCR com plasmídeo pFA156. As setas indicam exemplos de amplicons do tamanho esperado

A confirmação da identidade dos amplicons do transgene no tamanho correto de algumas amostras foi realizada por meio de seqüenciamento. A seqüência gerada a partir das plantas transgênicas foi avaliada em relação a sua identidade com a seqüência do íntron do gene *Ubi-1* de milho e do *SsMIR156b/c* (*pUBI::SsMIR156b/c*). O resultado mostrou uma alta identidade entre as seqüências (Figura 14), fato que reforça

o resultado da Figura 13, demonstrando a inserção do transgene no genoma das plantas de cana transformadas via biolística.

```

>lcl|51345
Length=580

Score = 946 bits (1048) Expect = 0.0
Identities = 559/580 (97%), Gaps = 1/580 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 11  GTTTCCTTTGTCGATGCTCACCTGTTGTTGGTGTTACTTCTGCAGCCAGAGATAAAC 70
          |||||
Sbjct 1   GTTTCCTTTGTCGATGCTCACCTGTTGTTGGTGTTACTTCTGCAGCCAGAGATAAAC 60

Query 71  AATCTCTAGATCTGTCTCAACAGTCTAGTATAACCCACATATATATACACGAAGAAAGA 120
          |||||
Sbjct 61  AATCTCTAGATCTGTCTCAACAGTCTAGTATAACCCACATATATATATACACGAAGAAAGA 120

Query 131 GAGCGAGGGAGAGTGACTATTACTGCGATGATCAGTAGTTCTATATATGATTTT-TATTT 189
          |||||
Sbjct 121 GAGCGAGGGAGAGTGACTATTACTACGATGATCAGTAGTTCTATATATGATTTTTTATTT 180

Query 190 TCATCGTTTTGTTGTTGTTTCATGATGTTGCGATTGTGGGGTGGAGGAGAGGTGGAGGCTG 249
          |||||
Sbjct 181 TCATCGTTTTGTTACTGTTTCATGATGTTGCGATTGTGGGGTGGAGAAGAGGTGGAGGCTG 240

Query 250 ACAGAAGAGAGTGAGCACACATGGTGCCCTTTCTTGCGATGATGAACGATCGAGAGGTTTCAT 309
          |||||
Sbjct 241 ACAGAAGAGAGTGAGCACACATGGTGCCCTTTCTTGCGATGATGAACGATCGAGAGGTTTCAT 300

Query 310 GCTCGAAGCTATGCGTGTTCACTTCTCTCTCTGTCAGCCATTAGAACTCTCTCTCGATCG 369
          |||||
Sbjct 301 GCTCGAAGCTATGCGTGCTCACTTCTCTCTCTGTCAGCCGTTAGAACTCTCTCTCGATCG 360

Query 370 CACCCCTCCTCGATCTCTCTTTTCGTTCTCTGTCAATCTCTACCATGGTGATATTTATTTG 429
          |||||
Sbjct 361 CACCCCTCCTCGATCTCTCTTTTCGTTCTCTGTCAATCTCTCCCATGGTGATATTTATTTG 420

Query 430 CTTCTCTGTGTGTTCTCTTTTCTTAAGCACAAACACGACCTGTTTCATGTTGCCTTAGGTA 489
          |||||
Sbjct 421 CTTGTCTGCGTGTCTCTTTTCTTAAGCACAGACACGACCGATTACGGTGCCTTAGGTGT 480

Query 490 TTTTTCACATTTGCCTGAAGAGAGGAAGGCAAGGGGAGATGGGTTTTTGAAGGTTTGA 549
          |||||
Sbjct 481 TTTTTCACATTTGCCTGAAGAGAGGAAGGCAAGGGGAGATGGGTTTTTGAAGGTTTGA 540

Query 551 CAGAAGAGAGTGAGCACACNCGGTGGTTTCTTANCATGAG 589
          |||||
Sbjct 541 CAGAAGAGAGTGAGCACACNCGGTGGTTTCTTANCATGAG 580
  
```

Figura 14 – Resultado da análise da identidade entre a seqüência de plantas transgênicas (Sbjct) e a seqüência do *pUBI::SsMIR156b/c* (Query) através da ferramenta BLAST “two sequences” no banco de dados do NCBI (GenBank). A seta aponta a porcentagem de identidade. Retângulo vermelho indica parte da seqüência que pertence ao íntron do gene *Ubi-1* de milho. Retângulos amarelos indicam as duas seqüências maduras características do gene *SsMIR156b/c* (Figura 4)

Como visto, 67% das plantas regeneradas em meio seletivo apresentam o transgene de interesse (8/12). Nas demais plantas, ocorreu apenas a integração do

gene marcador de seleção (*npt-II*) ou nenhum dos transgenes foi detectado (plantas escape).

Fatores importantes que afetam a inserção de transgenes via biolística são o tamanho dos vetores e a quantidade de DNA aplicado no preparo de partículas, já que isto influencia diretamente o número de cópias a serem bombardeadas (PICELLI, 2010). Na realização deste experimento, foram usados 5µg de DNA de cada vetor no preparo de partículas. Entretanto, o número de cópias do pFA156 (vetor com o gene de interesse) por preparo foi menor em vista de que seu tamanho ser maior do que o pHA9 (vetor com o gene marcador de seleção). Conseqüentemente, maior quantidade de vetores contendo o gene marcador de seleção foi utilizada por bombardeamento, aumentando a chance de este ser integrado no tecido alvo. Passarin (2009) apresentou uma maior eficiência de co-transformação quando usou vetores de menor tamanho contendo o gene de interesse. Segundo Altpeter et al. (2005), quanto maior o tamanho do vetor utilizado na transformação por biolística maior a dificuldade de obter transformantes estáveis.

Em relação ao surgimento de plantas escape, é considerado que embora o método de seleção usando geneticina seja bastante eficiente é comum que uma baixa porcentagem de plantas não transformadas consigam crescer no meio seletivo, sendo este fenômeno relatado por vários autores na transformação genética de cana de açúcar (ARENCIBIA et al., 1998; FALCO, TULMANN, ULIAN et al., 2000; PASSARIN, 2009; PICELLI, 2010; BARBOSA, 2010).

2.3.5 Análise do acúmulo do *SsmiR156* maduro em plantas transformadas.

Baseados na hipótese de que a expressão do gene *MIR156b/c* deve ser maior em plantas em que houve integração do transgene *pUBI::SsMIR156b/c*, avaliou-se o acúmulo do miR156 maduro via RT-qPCR em 10 plantas selecionadas como transformantes positivas via PCR (Figura 13). Como controles, foram utilizadas plantas selvagens crescidas *in vitro* e plantas transformadas contendo somente o gene de seleção *npt-II*. Por motivos de tempo, as análises foram feitas utilizando-se material *in vitro*. Entretanto, avaliações destas plantas em condições de casa de vegetação serão realizadas futuramente.

A Figura 15 mostra o resultado da análise de expressão relativa do *SsmiR156* maduro em plantas controle e transformadas com o transgene *pUBI::SsMIR156b/c*. Observa-se grande variabilidade na expressão deste miRNA nas plantas transgênicas, as quais apresentam níveis similares, menores ou maiores de transcritos quando comparadas as plantas controle. Segundo Lakshmanan et al. (2005), o processo de transformação genética via biolística é considerada a principal metodologia usada na introdução de DNA exógeno no genoma de cana de açúcar, embora uma grande variação na expressão do transgene é encontrada nas plantas transgênicas produzidas por este método.

Curiosamente, plantas crescidas *in vitro* e que não passaram pelo processo de transformação (WT) apresentaram expressão menor do que as plantas controle -1 e -2 transformadas unicamente com o gene *npt-II*. Isto sugere que inserção de DNA exógeno ou estresses gerados durante o processo de transformação genética via biolística, ou mesmo o crescimento das plantas em meio com antibiótico podem influenciar no padrão de expressão gênica desse miRNA.

Figura 15 – Expressão relativa do *SsmiR156* maduro em plantas transformadas com o transgene *pUBI::SsMIR156b/c*. Três controles foram usados, duas plantas transformadas unicamente com o *npt-II* (-1 e -2) e uma amostra representando um pool de seis plantas crescidas *in vitro* sem passar pelo processo de transformação (WT). Eventos positivos estão identificados pelo símbolo positivo (+) e sua respectiva numeração (1-10). O nível do transcrito é representado como uma razão (expressão relativa) do valor absoluto da expressão do *SsmiR156* maduro pelo valor absoluto da expressão do gene normalizador “*ribossomal 25S*”

Nos eventos +2, +4 e +10 observa-se aumento da expressão do *SsmiR156* maduro causada possivelmente pela expressão do transgene de interesse. Os níveis de expressão na maioria dos outros eventos parece não ter mudado consideravelmente em relação aos controles, indicando que o transgene *pUBI::SsMIR156b/c* talvez não tenha sido integrado corretamente ou sua expressão foi inibida por mecanismos endógenos de silenciamento que podem incluir regulação transcricional ou pós-transcricional; ambos processos têm sido observados em transformação de cana de açúcar (INGELBRECHT et al., 1999; WEI et al., 2003; MUDGE et al., 2009). É importante ressaltar que os resultados dos experimentos de análise de expressão do *SsmiR156* refletem a detecção dos transcritos tanto do transgene quanto de precursores *SsMIR156* endógenos. Interessantemente, a planta +7 apresentou níveis bem mais baixos de transcritos do que nos controles e demais eventos de transformação, sugerindo que a integração do transgene em seu genoma desencadeou

mecanismos de silenciamento gênico que culminaram na redução de expressão do transgene e dos precursores endógenos.

A expressão do transgene é dependente de vários fatores, tais como a região de integração no genoma. Dependendo do sítio de inserção, a expressão do transgene pode ser acentuada, suprimida ou desregulada (DE BLOCK, 1993). O processo de bombardeamento de partículas causa integração do transgene em regiões aleatórias ao longo do genoma da planta, não havendo direcionamento exato do sítio de inserção (PUCHTA, 1998). Portanto, é possível que o transgene seja integrado numa região altamente condensada da cromatina, apresentando expressão muito baixa ou nula. A integridade do transgene após a inserção também é uma característica determinante no sucesso da transformação genética. A presença de uma ou mais cópias rearranjadas podem levar ao silenciamento gênico de outras cópias do transgene, mesmo se estas estão inseridas de forma intacta e funcional no genoma (KOHLI et al., 1999).

A atividade do promotor é outro fator a ser considerado quando analisada a expressão do transgene. É claramente conhecido que a atividade do promotor da ubiquitina responde a condições ambientais em milho (CHRISTENSEN; SHARROCK; QUAIL et al., 1992), e que este responde diferencialmente em condições de estresse biótico e abiótico em plantas transgênicas de cana de açúcar (BIRCH et al., 2000). A expressão do cassete de transformação usado neste trabalho para transformação genética está sob o controle do promotor *Ubi-1* de milho. Portanto, é possível que o padrão de expressão das plantas contendo o transgene *pUBI::SsMIR156b/c* seja alterado em resposta a diferentes condições de estresse. Além disso, não há estudos que descrevem a atividade do promotor *Ubi-1* de milho em diferentes órgãos ou estágios de desenvolvimento de cana de açúcar. Estudos adicionais devem ser feitos para elucidar o padrão de expressão temporal e espacial de transgenes direcionados pelo promotor *Ubi-1* de milho em cana de açúcar.

Os eventos +2, +4 e +10 não apresentam o fenótipo de alto grau de perfilhamento observado em plantas de milho e arroz que superexpressam esse miRNA (Figura 16). De fato, o padrão de perfilhamento desses eventos é similar ao das plantas controle, em condições de casa de vegetação. Tal observação sugere que a via *SsMIR156/SPL* não foi desregulada nesse eventos, embora observa-se aumento do

acúmulo do SsmiR156 nos tecidos foliares dessas plantas (Figura 15). Uma possibilidade é que o aumento de SsmiR156 não foi suficiente para desencadear o silenciamento diferencial das *SsSPLs* ou o promotor *Ubi-1* não possui atividade nas mesmas células em que as *SsSPLs* se expressam em estágios específicos de desenvolvimento da cana de açúcar. Nesse último caso, não ocorrerá expressão do transgene e dos *SsSPLs* nos mesmos tipos celulares ou estágios de desenvolvimento. Outra possibilidade é que o aumento de transcritos do SsmiR156 é independente da presença do transgene nessas plantas. É possível que o precursor *SsMIR156b/c* inserido no genoma de cana não seja funcional. Para testar tal hipótese, estamos transformando dicots tais como *Arabidopsis* e tabaco para confirmar ou não a funcionalidade do precursor *SsMIR156b/c*.

Os próximos passos de avaliação das plantas transgênicas de cana consistem na avaliação do perfil de expressão de diferentes *SsSPLs* em diferentes tecidos/órgãos, bem como a avaliação fenotípica mais detalhada de eventos selecionados.

Figura 16 – Fotos do perfilhamento de plantas transformadas, evento +2 (A), +4(B), +10(C) e plantas controle – não transformadas (D-E), após 70 dias em condições de casa de vegetação

2.4 Conclusões

Com base nos resultados apresentados, conclui-se que:

- Foram identificados seis genes regulados pelo miR156 presumivelmente da família de fatores de transcrição *SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like* (SPL) de cana de açúcar, classificados por meio de análise filogenética em comparação aos seus ortólogos em arroz e arabidopsis.
- Em órgãos/tecidos onde o SsmiR156 acumula em baixos níveis, ocorre aumento do acúmulo de transcritos intactos do gene *SsPL1*, confirmando sua regulação pós-transcricional. A expressão do gene *SsSPL1* foi maior em *leaf roll* (primórdios foliares e ápice vegetativo) e gema lateral.
- A Sequência do precursor do *SsMIR156b/c* apresenta alta similaridade com seus homólogos exclusivos de monocotiledôneas, suportando a hipótese de que este gene sofreu alta pressão de seleção durante a evolução das gramíneas.
- A integração do transgene *pUBI::SsMIR156b/c* no genoma de cana de açúcar via biolística confirma a viabilidade do método de transformação, utilizando calos embriogênicos.
- O aumento no acúmulo do miR156 em alguns eventos de transformação é causada possivelmente pela expressão do transgene *pUBI::SsMIR156b/c*.
- Menor acúmulo do miR156 em alguns eventos de transformação, sugere que a inserção do transgene no genoma de cana desencadeou mecanismos de silenciamento gênico que culminaram na redução de expressão do transgene e dos precursores endógenos.

Referências

ALTPETER, F.; BAISAKH, N.; BEACHY, R.; BOCK, R.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P.; DANIELL, H.; DATTA, K.; DATTA, S.; DIX, P. Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 15, n. 3, p. 305-327, 2005.

ARENCIBIA, A.; CARMONA, E.; TELLEZ, P.; CHAN, M.; YU, S.; TRUJILLO, L.; ORAMAS, P. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Transgenic Research**, London, v. 7, n. 3, p. 213-222, 1998.

AXTELL, M. J.; BOWMAN, J. L. Evolution of plant microRNAs and their targets. **Trends in Plant Science**, London, v. 13, n. 7, p. 343-349, 2008.

BARBOSA, A.L. **Regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos e discos foliares visando transformação genética de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. 2010. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BIRCH, R. Plant transformation: problems and strategies for practical application. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 297-326, 1997.

BIRCH, R.; BOWER, R.; ELLIOTT, A.; HANSOM, S.; BASNAYAKE, S.; ZHANG, L. Regulation of transgene expression: progress towards practical development in sugarcane, and implications for other plant species. **Developments in Plant Genetics and Breeding**, Brisbane, v. 5, p. 118-125, 2000.

CALSA, T.; FIGUEIRA, A. Serial analysis of gene expression in sugarcane (*Saccharum* spp.) leaves revealed alternative C-4 metabolism and putative antisense transcripts. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 63, n. 6, p. 745-762, Apr. 2007.

CHRISTENSEN, A.; SHARROCK, R.; QUAIL, P. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. **Plant Molecular Biology**, Dordrech, v. 18, n. 4, p. 675-689, 1992.

CHUCK, G.; CIGAN, A.; SAETEURN, K.; HAKE, S.. The heterochronic maize mutant Corngrass1 results from overexpression of a tandem microRNA. **Nature Genetics**, New York, v. 39, n. 4, p. 544-549, 2007.

CHUCK, G.; WHIPPLE, C.; JACKSON, D.; HAKE, S. The maize SBP-box transcription factor encoded by tasselsheath4 regulates bract development and the establishment of meristem boundaries. **Development**, Cambridge, v. 137, n. 8, p. 1243, 2010.

DE BLOCK, M. The cell biology of plant transformation: current status, problems, prospects and the implications for the plant breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 71, p. 1-14, 1993.

DOEBLEY, J.; STEC, A. Genetic-analysis of the morphological differences between maize and teosinte. **Genetics**, Austin, v. 129, n. 1, p. 285-295, 1991.

DOYLE, J.; DOYLE, J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, London, v. 19, n. 11, p. 11-15, 1987.

FALCO, M.; TULMANN NETO, A.; ULIAN, E. Transformation and expression of a gene for herbicide resistance in a Brazilian sugarcane. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 12, p. 1188-1194, 2000.

FALCO, M.C. **Transformação de cana-de-açúcar para resistência do herbicida glufosinato de amônio via biolística**. 1998. 129 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

FRANÇOIS, I.; BROEKAERT, W.; CAMMUE, B. Different approaches for multi-transgene-stacking in plants. **Plant Science**, Limerick, v. 163, n. 2, p. 281-295, 2002.

GUO, A. Y.; ZHU, Q. H.; GU, X. C.; GE, S.; YANG, J.; LUO, J. C Genome-wide identification and evolutionary analysis of the plant specific SBP-box transcription factor family. **Gene**, Amsterdam, v. 418, n. 1/2, p. 1-8, 2008.

HA, M.; PANG, M. X.; AGARWAL, V.; CHEN, Z. J. Interspecies regulation of microRNAs and their targets. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1779, n. 11, p. 735-742, 2008.

INGELBRECHT, I.; IRVINE, J.; MIRKOV, T. Posttranscriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploid genome. **Plant Physiology**, Washington, v. 119, n. 4, p. 1187, 1999.

ISKANDAR, H.; SIMPSON, R.; CASU, R.; BONNETT, G.; MACLEAN, D.; MANNERS, J. Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrech, v. 22, n. 4, p. 325-337, 2004.

JESUS, F.A. de. **Transformação genética de cana-de-açúcar com os genes da aquaporina SspTIP1;1 e SspPIP1;4**. 2010. 55 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

JIAO, Y.; WANG, Y.; XUE, D.; WANG, J.; YAN, M.; LIU, G.; DONG, G.; ZENG, D.; LU, Z.; ZHU, X. Regulation of OsSPL14 by OsmiR156 defines ideal plant architecture in rice. **Nature Genetics**, New York v. 42, p. 541-544, 2010.

JONES-RHOADES, M.; BARTEL, D.; BARTEL, B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 19-53, 2006.

KLEIN, J.; SAEDLER, H.; HUIJSER, P. A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the *Antirrhinum majus* floral meristem identity gene SQUAMOSA. **Molecular & General Genetics**, New York, v. 250, n. 1, p. 7-16, 1996.

KOHLI, A.; GRIFFITHS, S.; PALACIOS, N.; TWYMAN, R.; VAIN, P.; LAURIE, D.; CHRISTOU, P. Molecular characterization of transforming plasmid rearrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the CaMV 35S promoter and confirms the predominance of microhomology mediated recombination. **The Plant Journal**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 591-601, 1999.

KUMAR, S.; DANIELL, H. Engineering the chloroplast genome for hyperexpression of human therapeutic proteins and vaccine antigens. **Methods In Molecular Biology**, Dordrecht, v. 267, p. 365-384, 2004.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R.J.; WANG, L.; ELLIOTT, A.; GROF, C.P.L.; BERDING, N.; SMITH, G.R. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, n. 10, p. 1007-1015, 2006.

_____. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Oxon, v. 41, n. 4, p. 345-363, 2005.

LEYSER, O. The control of shoot branching: an example of plant information processing. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 32, n. 6, p. 694-703, 2009.

LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $[\Delta\Delta CT]$ method. **Methods**, New York, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

MARCHLER-BAUER, A.; ANDERSON, J.; CHITSAZ, F.; DERBYSHIRE, M.; DEWEESE-SCOTT, C.; FONG, J.; GEER, L.; GEER, R.; GONZALES, N.; GWADZ, M. CDD: specific functional annotation with the conserved domain database. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 37, n. suppl 1, p. D205, 2009.

MUDGE, S.; OSABE, K.; CASU, R.; BONNETT, G.; MANNERS, J.; BIRCH, R. Efficient silencing of reporter transgenes coupled to known functional promoters in sugarcane, a highly polyploid crop species. **Planta**, Berlin, v. 229, n. 3, p. 549-558, 2009.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

PASSARIN, D.M.M. **Transformacao genética de cana de acucar por biolística e *Agrobacterium tumefaciens*, visando estudar o mecanismo de morte celular programada**. 2009. 147 p. Tese Doutorado (Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

PICELLI, E. **Cultura de tecidos e transformação genética com o gene *Ddm1* no estudo do silenciamento de elementos de transposição em cana-de-açúcar**. 2010.140p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

PUCHTA, H. Towards targeted transformation in plants. **Trends in Plant Science**, London, v. 3, n. 3, p. 77-78, 1998.

RHOADES, M.; REINHART, B.; LIM, L.; BURGE, C.; BARTEL, B.; BARTEL, D. Prediction of plant microRNA targets. **Cell**, Cambridge, v. 110, n. 4, p. 513-520, 2002.

RECH, E.L.; ARAGÃO, F.J.L. BIOBALÍSTICA. In: BRASILEIRO, A.CM.; CARNEIRO V.T.C (Ed.) **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, SPI; EMBRAPA, Cenargem, 1998. p. 51-63.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method - a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SCHWAB, R.; PALATNIK, J.; RIESTER, M.; SCHOMMER, C.; SCHMID, M.; WEIGEL, D. Specific effects of MicroRNAs on the plant transcriptome. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 8, n. 4, p. 517-527, 2005.

SCHWARZ, S.; GRANDE, A.V.; BUJDOSO, N.; SAEDLER, H.; HUIJSER, P. The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 control shoot maturation in *Arabidopsis*. **Plant Molecular Biology**, Dordrech, v. 67, n. 1, p. 183-195, 2008.

SERENO, M.L. **Caracterização e análise de expressão dos genes de metalotioneínas dos tipos 1,2 e 3 de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) sob condições de estresse**. 2009. 164 p. Tese (Doutorado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

SITNIKOVA, T.; RZHETSKY, A.; NEI, M. Interior-branch and bootstrap tests of phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 12, n. 2, p. 319, 1995.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. Clustal-W - improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

VAIN, P.; MCMULLEN, M.; FINER, J. Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 12, n. 2, p. 84-88, 1993.

VARKONYI-GASIC, E.; WU, R.; WOOD, M.; WALTON, E.; HELLENS, R. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. **Plant Methods**, New York, v. 3, n. 12, p. 1-12, 2007.

WANG, J.; SCHWAB, R.; CZECH, B.; MICA, E.; WEIGEL, D. Dual effects of miR156-targeted SPL genes and CYP78A5/KLUH on plastochron length and organ size in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell Online**, Rockville, v. 20, n. 5, p. 1231, 2008.

WANG, S.; ZHU, Q. H.; GUO, X. Y.; GUI, Y. J.; BAO, J. D.; HELLIWELL, C.; FAN, L. J. Molecular evolution and selection of a gene encoding two tandem microRNAs in rice. **Febs Letters**, Amsterdam, v. 581, n. 24, p. 4789-4793, 2007.

WEI, H.; WANG, M.; MOORE, P.; ALBERT, H. Comparative expression analysis of two sugarcane polyubiquitin promoters and flanking sequences in transgenic plants. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 160, n. 10, p. 1241-1251, 2003.

XIE, K.; WU, C.; XIONG, L. Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice. **Plant Physiology**, Washington, v. 142, p. 280-293, 2006.

YAMASAKI, K.; KIGAWA, T.; INOUE, M.; TATENO, M.; YAMASAKI, T.; YABUKI, T.; AOKI, M.; SEKI, E.; MATSUDA, T.; NUNOKAWA, E. A novel zinc-binding motif revealed by solution structures of DNA-binding domains of *Arabidopsis* SBP-family transcription factors. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 337, n. 1, p. 49-63, 2004.

ZANCA, A.; VICENTINI R.; ORTIZ F.; DEL BEM, L.; SILVA M.; VINCENTZ, M.; NOGUEIRA, F. Identification and expression analysis of microRNAs and targets in the biofuel crop sugarcane. **BMC Plant Biology**, Michigan, v. 10, n. 1, p. 260-269, 2010.

ZHANG, B.; WANG, Q.; WANG, K.; PAN, X.; LIU, F.; GUO, T.; COBB, G.; ANDERSON, T. Identification of cotton microRNAs and their targets. **Gene**, Amsterdam, v. 397, n. 1/2, p. 26-37, 2007.

3 BASES MOLECULARES DO PROCESSO DE EMERGÊNCIA DA GEMA AXILAR EM CANA DE AÇÚCAR.

Resumo

A emergência da gema axilar é um processo crucial do desenvolvimento que controla a arquitetura das plantas, sendo considerado um fator determinante da produtividade. Gemas frequentemente se encontram num estágio dormente, mas podem tornar-se ativas segundo o padrão de desenvolvimento da planta, determinado geneticamente e em resposta a modificações ambientais. A ativação da gema envolve mudanças na expressão gênica e resposta hormonal, as quais são possivelmente moduladas em parte por miRNAs. Para cana de açúcar, a qual é tipicamente propagada vegetativamente usando colmos que contém uma gema ligada a um fragmento do caule, a emergência da gema é um passo fundamental no estabelecimento de novas plantações; entretanto este processo é pobremente caracterizado ao nível molecular. Neste contexto e ante o crescente arsenal de ferramentas moleculares disponíveis para cana de açúcar, decidiu-se investigar as bases moleculares associadas à emergência da gema axilar de cana de açúcar. Usando técnicas de seqüenciamento em larga escala, foram geradas bibliotecas de pequenos RNAs de gemas axilares dormentes e em desenvolvimento, entre as quais foi identificada a expressão de 25 miRNAs conservados. Análises computacionais permitiram identificar, no genoma de cana de açúcar, genes associados a brotação lateral e resposta a fitormônios, para os quais, juntos com alguns miRNAs identificados nas bibliotecas, foi realizada análise de expressão via RT-qPCR em três estágios de desenvolvimento: gemas dormentes e gemas com 2 e 5 dias após o plantio. Os resultados indicam que o miR159, o miRNA mais expresso nas bibliotecas de pequenos RNAs, regula a expressão do seu gene alvo *SsGAMYB* durante a emergência das gemas. Este gene é um fator de transcrição que tem sido implicado com ativação de genes em resposta a giberelina. De forma similar, a expressão do gene *SsSPL1* parece ser modulada pelo miR529, embora esta *SPL* também apresente sítio de regulação para o miR156 o qual não parece estar implicado na regulação do *SsSPL1* durante a emergência da gema. Interessantemente, contrário ao que se observa para milho e arroz, o gene *Sstb1* parece não ser um fator determinante na quebra da dominância apical de gemas axilares. Durante a fase inicial do desenvolvimento das gemas, foi também observado alteração na expressão de genes que regulam processos de transdução de sinal associados aos fitohormônios auxina e etileno. Nossos resultados sugerem que a emergência das gemas axilares é um processo dinâmico em que fitohormônios, fatores de transcrição e miRNAs participam conjuntamente

Palavras-chave: Gema axilar; Fitohormônios; Brotação lateral; Cana-de-açúcar; MicroRNAs; Fatores de transcrição

Abstract

Lateral bud outgrowth is a crucial developmental process that controls plant shoot

architecture and, therefore, biomass production. For the biofuel crop sugarcane, which is typically propagated via rhizomes, efficient bud outgrowth is also important to establish a new plantlet on the field. Although bud outgrowth is to some extent influenced by environmental factors, it is determined mainly by the plant's genetic program that likely includes small RNAs. Using deep sequencing approaches, we have generated two small RNA libraries from dormant and outgrown sugarcane lateral buds. Preliminary analyses indicate that a select group of small RNAs are expressed in lateral buds, including over 200 repeat-associated small interfering RNAs (rasiRNAs) and 25 conserved microRNAs (miRNAs). Amongst the miRNAs, miR159 was the most sequenced in the two libraries. We evaluated miR159 accumulation pattern in addition to other selected miRNAs via qRT-PCR in dormant and developing buds. The majority of the evaluated miRNAs accumulate differentially during bud development, though with distinct expression patterns. Interestingly, miR159 accumulates at high levels in dormant buds, but scarcely in developing buds. Conversely, the experimentally confirmed miR159 target, a sugarcane GAMyB-like gene (*SsGAMyB*), is lowly expressed in dormant buds while its transcripts accumulate at higher levels in developing buds. GAMyB-like genes encode R2R3 MYB domain transcription factors that have been implicated in gibberellin (GA) and abscisic acid (ABA) signaling in germinating seeds. Our data suggest miR159 regulates *GAMyB-like* genes during sugarcane bud outgrowth. Similarly, *SsSPL1* is regulated posttranscriptionally by the miR529, though this gene has sites for both miR529 and miR156. Interestingly, the expression profile of sugarcane *tb1* suggests that this gene has minor or negligible effects on bud outgrowth. Auxin and ethylene-associated regulatory pathways are affected during sugarcane bud development. Taken together, our data indicate that sugarcane bud outgrowth from rhizomes is a complex developmental process involving hormones, transcription factors as well as microRNAs and other regulatory RNAs.

Keywords: Lateral bud; Hormone; Bud outgrowth; Sugarcane; MicroRNAs; Transcription factors

3.1 Introdução

A arquitetura dos vegetais é um dos aspectos cruciais na produção, sendo definida como a organização tridimensional do corpo da planta, incluindo padrão de brotação lateral, forma e posição das folhas e órgãos florais (REINHARDT; KUHLEMEIER, 2002). Um dos principais fatores na determinação da arquitetura das plantas é a regulação da emergência da gema vegetativa a qual é formada nas axilas de folhas. A Gema se caracteriza por ser uma estrutura contendo meristema axilar capaz de produzir novos eixos de crescimento com o mesmo potencial de desenvolvimento que o meristema do qual é derivado. Entretanto frequentemente seu crescimento é restrito após a formação de alguns primórdios não expandidos ficando num estágio de dormência (ONGARO et al., 2008; LEYSER, 2009). Ativação da gema

depende do padrão de desenvolvimento característico de cada espécie, sendo este determinado geneticamente em interação com as condições ambientais (SHIMIZU-SATO e MORI, 2001). Recentemente varias pesquisas ao nível fisiológico e molecular têm descrito vias em que a expressão gênica junto com ação hormonal regulam a ativação da gema (LEYSER, 2009). Dentro desta vias microRNAs parecem ser importantes reguladores, já que vários membros de famílias gênicas envolvidas em mecanismos de brotação de gemas laterais são alvos de regulação por miRNAs, os quais, por sua vez podem interagir com fitohormônios, sugerindo que esses RNAs estão envolvidos nesse aspecto do desenvolvimento vegetal.

MicroRNAs representam uma classe de pequenos RNAs (20-27 nt) não codantes que regulam transcricionalmente ou pós-transcricionalmente a expressão de genes endógenos, modelando o transcriptoma e a produção de proteínas. Seu papel no desenvolvimento vegetal é comprovado pela avaliação fenotípica e molecular de plantas transgênicas e de mutantes defectivos na produção de tais RNAs. O seqüenciamento de populações de RNAs regulatórios possibilitou a identificação de miRNAs conservados e específicos em diferentes espécies vegetais, embora estudos em plantas de importância econômica como cana de açúcar sejam ainda incipientes.

A brotação lateral é um importante fator agrônomo para cana de açúcar que afeta o perfilhamento, rebrota e estabelecimento da cultura, já que estas são tipicamente propagas de maneira vegetativa, usando para tal fim gemas axilares ligadas a uma parte do colmo. Uma eficiente emergência da gema garante um uniforme e apropriado estabelecimento da cultura em campo. Embora a reprodução vegetativa seja o principal mecanismo de multiplicação de cana de açúcar, o processo da emergência da gema é pobremente caracterizado principalmente ao nível molecular e fisiológico. Um melhor entendimento do controle da brotação lateral em cana de açúcar poderá contribuir não somente para o melhor entendimento dos mecanismos associados ao desenvolvimento inicial desta cultura, mas também ter potenciais aplicações no melhoramento vegetal.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo investigar as bases moleculares associadas ao desenvolvimento da gema axilar-lateral de cana de açúcar,

monitorando o padrão de expressão de genes e miRNAs possivelmente vinculados a este processo.

3.2 Matérias e métodos

Os experimentos e demais atividades referentes ao presente trabalho foram desenvolvidas no laboratório de Biologia Molecular e genômica, CEBTEC, do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

3.2.1 Identificação de seqüências de genes de interesse e sua análise filogenética

Para a realização deste trabalho, fez-se necessário a obtenção de seqüências em cana de açúcar de genes associados com a brotação lateral e resposta hormonal, incluindo microRNAs (LEYSER, 2009; LIU et al., 2009). Primeiramente, seqüências de genes de interesse foram obtidas de *arabidopsis*, arroz, sorgo e milho e posteriormente usadas para identificar seus homólogos via *TBLASTn* em cana de açúcar, usando o banco público de dados *TIGR Gene Index* (78.924 seqüências únicas, release 3.0, <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi>). Neste banco estão agregadas *ESTs* do *SUCEST*, juntamente com seqüências provenientes de outros projetos de seqüenciamento em cana.

Com o intuito de confirmar a identidade dos genes encontrados em cana de açúcar e inferir sobre sua relação evolutiva com seus homólogos em outras espécies, foram realizadas análises filogenéticas para cada um deles. Na construção das árvores, foram usadas seqüências de domínios conservados dos genes preditos, juntamente com os domínios de seus homólogos.

As análises filogenéticas foram realizadas tal como descrito no capítulo 2 desta dissertação. Seqüências dos genes homólogos, utilizados na construção da filogenia, foram obtidas para arroz, milho, e cevada no *Genbank* (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); para sorgo no DOE Joint Genome institute (<http://genome.jgi-psf.org/Sorbi1/Sorbi1.home.html>); e para *arabidopsis* no TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>).

3.2.2 Material vegetal

O material vegetal da cultivar de cana de açúcar SP803280 foi cedido pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), oriundo da Unidade Experimental de Araras. A cultivar SP803280 é a mais representativa do projeto SUCEST (VETTORE et al., 2001) e em termos agronômicos é reconhecida pelo alto teor de sacarose, perfilhamento intermediário e produtividade na soqueira (COPERSUCAR, 2010).

Para as análises propostas, gemas laterais foram coletadas em três estágios do desenvolvimento: gemas dormentes (presente em plantas intactas de aproximadamente oito meses de idade); gemas em desenvolvimento dois dias após o plantio (2DAP) e gemas em desenvolvimento cinco após o plantio (5DAP). Para obtenção de gemas 2DAP e 5DAP, amostras de parte do caule contendo uma gema axilar (tolete; Figura 17) foram plantadas em substrato apropriado e mantidas em condições de casa de vegetação no CEBTEC.

Figura 17 - Esquema representativo do tolete de cana de açúcar plantado para obtenção de gemas em desenvolvimento. Seta preta indica posição da gema axilar

3.2.3 Cortes histológicos de gemas em diferentes estágios do desenvolvimento

Cortes histológicos longitudinais de gemas dormentes e 5DAP foram realizados com o intuito de comparar suas diferenças anatômicas. Este trabalho foi realizado no Laboratório de anatomia Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”,

chefeado pela profa. Dr. Beatriz Appezzato-da-Glória.

Para análise histológica, foram selecionados, aleatoriamente, três gemas para cada estágio avaliado. Foram realizados cortes de 50µm usando micrótomo de deslize. As seções foram clarificadas com NaOH a 20% por 10 minutos, neutralizadas com água acética a 1% e posteriormente coradas com azul de toluidina a 0,05% em tampão fosfato (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964), para finalmente realizar a montagem das lâminas. Os cortes foram analisados e fotodocumentados utilizando-se estereoscópio Leica S8AP0.

3.2.4 Identificação de miRNAs conservados expressos em gema axilar de cana de açúcar

Com o intuito de identificar microRNAs expressos em gemas laterais de cana-de-açúcar, RNA total de gemas dormentes e gemas 2DAP foi utilizado na confecção de bibliotecas de pequenos RNAs. Um *pool* de seis plantas foi usado para extração de RNA total, utilizando-se o reagente TRizol (invitrogen) como descrito .

A confecção das bibliotecas de pequenos RNAs foi realizada pela empresa suíça FASTERIS (www.fasteris.com), a qual é especializada em confecção de bibliotecas de cDNA/DNA para seqüenciamento utilizando o sistema SOLEXA/ILLUMINA. Esse sistema de seqüenciamento é capaz de gerar milhões de *reads* (~30 nt) de alta qualidade (LU et al., 2005).

Após o envio dos resultados de sequenciamento pela empresa FASTERIS, análises de bioinformática foram realizadas em colaboração com o Dr. Renato Vicentini (CBMEG, UNICAMP). Foram selecionadas seqüências com tamanho compreendido entre 18 e 26 nt, das quais seqüências únicas com mais que 15 *reads* foram avaliadas contra o banco *miRBase* versão 15 (<http://microrna.sanger.ac.uk/>), utilizando-se o algoritmo BLASTn. Considerou-se como candidatos a miRNA aquelas seqüências que apresentaram entre zero e três *mismatches* ou não-pareamentos com seqüências homólogas de miRNAs depositadas no *miRBase*v15.

3.2.5 Análises de expressão gênica e acúmulo de miRNAs nas etapas iniciais da emergência da gema axilar

O acúmulo de transcritos, tanto de genes selecionados como de miRNAs maduros, foi monitorado em três estágios de desenvolvimento: gemas laterais dormentes, gemas 2DAP e gemas 5DAP. Em cada estágio, um *pool* de cinco gemas foi utilizado na extração de RNA total utilizando-se o reagente TRizol (invitrogen) como descrito anteriormente.

O cDNA foi sintetizado a partir de 1,5µg de RNA total, usando a técnica *pulsed* RT-PCR (item 2.2.5 do capítulo 2), que permite a detecção do mRNA e miRNA maduro num mesmo cDNA (VARKONYI-GASIC et al., 2007; ZANCA et al., 2010).

A técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) foi utilizada para verificar o perfil da expressão relativa dos genes selecionados. Para isto, primeiramente foram desenhados iniciadores específicos (Anexo 4) a partir das seqüências previamente identificadas (Tabela 4), levando em consideração características como temperatura de fusão (T_m) $58^\circ \pm 5^\circ\text{C}$, comprimento do primer (18–25 pb) e tamanho do amplicom (60 - 240 pb). Para os genes alvos de miRNAs, os iniciadores foram localizados flanqueando o sitio de reconhecimento do miRNA. Desta forma, garantiu-se que apenas transcritos não clivados foram amplificados. Foi desenhado um iniciador direto específico para cada miRNA (Anexo 3). Tal iniciador é quem determina a especificidade na detecção de miRNAs maduros, já que o iniciador reverso anela na região do RT *stem-loop* que é comum para todos os miRNAs (Figura 5 no capítulo 2). Seqüências de iniciadores para os genes *SsGAMYB*, miRNA319 e miRNA159 foram gentilmente cedidos pelo professor Dr. Paulo Cavalcanti Gomes Ferreira da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

As reações de amplificação RT-qPCR foram realizadas em volume final de 25µl, usando 5µl de cDNA na diluição 1:80 (v:v), 0,3µl de cada iniciador na concentração 10mM, 12,5µl de platinum sybr green qPCR (invitrogen) e 6,9µl de água milli-Q. A amplificação foi conduzida em termociclador *Applied Biosystems 7500/7500 fast*. O programa utilizado foi: 50°C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos e 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos, com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão. Após a termociclagem, curvas de dissociação foram

determinadas para cada produto amplificado (curva de *melting*). Todas as reações foram feitas em duplicatas, incluindo uma amostra controle (NTC) contendo água milliQ. O gene *ribossomal* 25S foi utilizado como controle interno ou normalizador, embora quatro genes (Anexo 4) candidatos foram previamente testados (dados não mostrados). A eficiência de amplificação de cada par de iniciador foi determinada por curva padrão utilizando-se diluições seriadas de cDNA, sendo calculada pela equação: $E = [10^{(1/\text{pente})}] - 1$. Para cada gene o valor de E ficou entre 0,9 e 1,1. O cálculo da expressão relativa foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), como descrito no item 2.2.12 do capítulo 2.

3.2.7 Confirmação da clivagem de genes alvo de miRNAs por 5' RACE

Baseado no fato de que a clivagem de mRNA-alvo pelo complexo *RISC* é guiada pelo miRNA maduro é a metodologia de ação mais comum dos miRNAs, foi usada a metodologia de 5' RACE modificado, para comprovar a regulação do gene *SsGAMYB* pelos miRNAs 159 e 319 e a regulação do gene *SsPL1* pelos miRNAs 156 e 529.

RNA total de gema dormiente e 5DAP foi utilizado para o experimento, utilizando-se o kit *GeneRacer* (Invitrogen). O experimento seguiu as recomendações do fabricante, iniciando-se na etapa de ligação do oligo de RNA ao RNA total. Ao tubo contendo o *oligo de RNA GeneRacer* pré-aliquotado (0,25 µg) foram adicionados 5µg de RNA total em 7 µL de água DEPC. O oligo foi ressuspendido na solução e então a mistura foi incubada a 65°C durante 5 minutos para desnaturação de estruturas secundárias. O tubo foi então colocado em gelo por 2 minutos, e posteriormente adicionou-se 1µl de 10X *Ligase Buffer*, 1µl de 10mM ATP, 1µl de *RNaseOut* (40U/µl), *T4 RNA ligase* (5U/µl), para completar um volume final de 10µl.

Posteriormente a reação foi incubada a 37°C por 1 hora, e depois colocada no gelo. O RNA total foi purificado com fenol:cloroformo e precipitado com etanol, acetato de sódio e glicogênio. O *pellet* resultante foi então ressuspendido em 10µl de água DEPC autoclavada.

Este RNA ligado ao *oligo de RNA GeneRacer* foi utilizado como molde para reação de transcrição reversa utilizando o *Kit Improm-II Reverse Transcriptase* (Promega). Ao RNA foi adicionado 1µl de oligo dT, 1µl de dNTP mix 10mM. As amostras

foram incubadas a 70°C por 10 minutos para desnaturação das estruturas secundárias e depois colocadas a 5°C por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 5µl Improm-II 5x Reaction Buffer, 2,4µl de MgC₂, RNase out 0,6µl e 1µl da enzima Improm-II *Reverse Transcriptase*. A reação foi incubada em termociclador com o seguinte programa: 25°C por 5 minutos, 42°C por 1 hora e 70°C por 15 minutos para inativação da enzima.

O cDNA foi utilizado para amplificações dos fragmentos clivados dos genes *GAMyb* e *SPL1* usando um iniciador senso específico para a sequência do *oligo de RNA GeneRacer* e iniciador reverso específico para a sequência do mRNA-alvo (Tabela Anexo 5). Com o intuito de obter maior especificidade dos *amplicons*, alíquotas do produto de PCR da primeira reação foram utilizadas para realizar mais uma amplificação, mas usando um par de iniciadores internos (Anexo 5) aos usados na primeira reação de PCR. Reações de PCR são mostradas nas Tabelas 2 e 3. Iniciadores para o gene *GAMyB* foram gentilmente cedidos pelo professor Dr. Paulo Cavalcanti Gomes Ferreira da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Tabela 2 - Reagentes utilizados na reação inicial de PCR para amplificação da extremidade 5' dos RNA-alvos

Reagentes	Volume (µl)
Iniciador Gene Racer 5' 10µm	3
Iniciador 1 gene específico Reverso, 10µm	1
cDNA	1
Tampão PCRx 10x	5
dNTP Mix 10 mM	1
Platinum taq PCRx 5U/µl	0,5
MgCl ₂ 50mM	2
Água milli-Q	36,5
Total	50

Tabela 3 - Reagentes utilizados na segunda reação de PCR para amplificação da extremidade 5' dos RNA-alvos

Reagentes	Volume (µl)
Iniciador Gene Racer 5' Nested	10µm
Iniciador 2 gene específico Reverso,	10µm
Produto PCR inicial	
Tampão PCRx 10x	
dNTP Mix 10 mM	
Platinum taq PCRx 5U/µl	
MgCl ₂ 50mM	
Água milli-Q	
Total	

O programa de PCR usados para ambas PCR foi: 98°C por 30 segundos seguidos de 30 ciclos de 98°C por 10 segundos, 64°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e extensão de 72°C por 10 minutos. Os produtos das PCRs foram visualizado por eletroforese em gel de agarose 2,5%, em tampão de corrida TAE 1X, sob tensão constante de 100V.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Identificação *in silico* de seqüências de genes de interesse e sua análise filogenética

Seqüência de proteína de genes selecionados, foram usadas como *query* para identificar seus homólogos no banco de dados público de seqüências de cana de açúcar *TIGR Gene Index versao 3.0*, usando a ferramenta *TBLASTn*. Não foram identificados genes homólogos para todos aqueles associados com a brotação lateral em outras espécies vegetais, visto que o banco de dados de ESTs disponível não representa a totalidade dos genes de cana de açúcar, cujo genoma estrutural ainda não foi seqüenciado. Na Tabela 4 é apresentada a relação dos genes identificados e analisados nesse trabalho.

Tabela 4 - Genes de cana de açúcar possivelmente associados com a brotação lateral, resposta hormonal e interação miRNAs–fitohormônios

Gene	Acesso	Nomenclatura	Referencia
<i>Teosinte branched1 (tb1)</i>	AF322127	<i>Sstb1</i>	(LUKENS E DOEBLEY, 2001)
<i>AUXIN RESISTANT 1 (AXR1)</i>	TC91932	<i>SsAXR1-Like</i> <i>ou SsAXL</i>	(DHARMASIRI, <i>et al.</i> , 2007)
<i>PIN-FORMED1-like (PIN1-like)</i>	TC92953	<i>SsPIN1</i>	(CARRARO, <i>et al.</i> , 2006)
<i>GAMyB</i>	TC78488	<i>SsGAMyB</i>	(GUBLER <i>et al.</i> , 1995)
<i>Homeotic protein knotted-1(knotted1)</i>	TC78851	<i>SsKnotted1</i>	(VOLLBRECHT <i>et al.</i> , 1991)
<i>DICER-LIKE1 (DCL1)</i>	TC143136	<i>SsDCL1</i>	(PARK <i>et al.</i> , 2002)
<i>SQUA promoter-binding-protein (SPL)</i>	TC110345	<i>SsSPL1</i>	(KLEIN, SAEDLER, HUISJER <i>et al.</i> , 1996)
<i>Ethylene Responsive Factor 3 (ERF3)</i>	TC80579	<i>SsERF3</i>	(TRUJILLO <i>et al.</i> , 2008)

Com o intuito de validar as seqüências de cana de açúcar identificadas *in silico* dos genes *SsPIN1*, *SsGAMyB*, *SsKnotted1* e *SsDCL1*, realizou-se análise filogenética para cada um deles.

As seqüências de proteínas oriundas dos quatro gene analisados foram agrupadas com seus homólogos nas suas respectivas árvores (Figuras 18, 19, 20, 21). Os ramos que formam os grupos ortólogos para as proteínas analisadas tiveram suporte de *bootstrap* considerados como moderados (70% - 94%) e robustos (95% - 100%) (SCHNEIDER, 2003). Estes resultados dão uma maior confiabilidade sobre a verdadeira identidade destes genes, permitindo inferir sobre suas possíveis funções em cana de açúcar, baseado em estudos funcionais de seus ortólogos em outras espécies. Por exemplo, a proteína deduzida *SsKnotted1* pertence ao mesmo clado da *AtSTM* de

arabidopsis, sugerindo funções mais similares a esse membro da família do que a dos demais KNOXs de arabidopsis.

Figura 18 – Análise filogenética da *SsPIN1* com alguns membros da família PIN de outras espécies. Todos os valores de *bootstrap* em cada nó foram gerados a partir de 1000 réplicas. Dentro do retângulo estão localizadas possíveis genes homologos para o *SsPIN1* cuja sequência se encontra sublinhada em vermelho. As sequências usadas de arroz (Os) e arabidopsis (At) foram identificadas segundo (XU et al., 2005)

Figura 19 – Análise filogenética do *SsGAMyB* com alguns membros da família GAMYB de outras espécies. Todos os valores de *bootstrap* em cada nó foram gerados a partir de 1000 réplicas. Dentro do retângulo estão localizadas possíveis genes homólogos para o *SsGAMyB* cuja sequência se encontra sublinhada em vermelho. As seqüências de arroz usadas foram *OsGAMYB* (GI:1707640), *OsGAMYB-like1* (GI:78096655) e *OsGAMYB-like2* (GI:50399961); de milho foram *ZmGAMYB* (GI:226500172) e *ZmGAMYB-LIKE2* (GI:226497970); de sorgo *SbGAMYB* (Sb03g037680) e *SbGAMYB-LIKE2* (Sb01g015920); de arabidopsis foram *AtMYB33* (At5g06100) e *AtMYB65* (At3g11440); e de cevada foi *HvGAMYB* (GI:1200239)

Figura 20 – Análise filogenética de *Ssknotted1* com alguns membros da família KNOX de outras espécies. Todos os valores de *bootstrap* em cada nó foram gerados a partir de 1000 réplicas. Dentro do retângulo estão localizados possíveis homólogos para o fator de transcrição *Ssknotted1* (sublinhado em vermelho). As seqüências usadas de arroz (Os) milho (Zm) e arabidopsis (At) foram identificadas segundo (MUKHERJEE; BROCCIERI; BARGLIN 2009); para sorgo foi usada a *Sbknotted1* (Sbo1g009480)

Figura 21 – Análise filogenética da proteína *SsDCL1* com membros da família DCL de outras espécies. Todos os valores de *bootstrap* em cada nó foram gerados a partir de 1000 réplicas. Dentro do retângulo estão localizadas possíveis genes homólogos para a *SsDCL1* cuja seqüência se encontra sublinhada em vermelho. Arroz (Os). Arabidopsis (At)

Para a enzima *SsDCL1*, principal componente da via de ação do miRNAs (XIE et al., 2003), foi possível caracterizar três dos seis domínios funcionais característicos das enzimas DCL (Figura 22) (MARGIS et al., 2006). O fato de não conseguir identificar a totalidade dos domínios é atribuído a que esta seqüência veio de uma EST, as quais em sua maioria não representam o comprimento total do gene. A Seqüência de aminoácidos dos três domínios identificados na *SsDCL1* foi usada na realização da análise na construção da árvore filogenética e agrupou-a juntamente com DCL1 de outras espécies (Figura 21), dando uma maior confiabilidade ao resultado obtido.

Figura 22 – Domínios conservados identificados na *SsDCL1*. Dsrm : Motivo de ligação ao RNA dupla fita

Análise filogenética para as proteínas *SsERF3* e *Sstb1* não foi considerada necessária devido ao fato destas terem sido previamente caracterizadas (TRUJILLO et al., 2008; KARNO, 2007), assim como para a proteína *SsSPL1*, cuja análise filogenética é mostrada no capítulo 2 desta dissertação (item 2.3.1). No caso da *SsAXL*, foi realizado alinhamento com as seqüências homólogas de arabis (Figura 23), constatando-se altos valores de identidade ao nível de aminoácidos.

```

AtAXL  -----MAE PKTKYDRQLR IWGELGQSALETASI CLLNCG
AtAXR1  MQAVKRSRRHVEEE PT-----MVE PKTKYDRQLR IWGEVGOAALEEEASI CLLNCG
SsAXL   QATGRAETAAASP PPRPAAMAAA GVVAE PKTKYDRQLR IWGDQGOAALEEKASI CLLNCG

AtAXL  PTGSEALKNLVIGGIGSITIVDGSKVEIGDLGNNFMVDAKSVGQSRKTVCGFLQELNDS
AtAXR1  PTGSEALKNLVIGGIGSITIVDGSKVQFGDLGNNFMVDAKSVGQSKAKSVCAFLQELNDS
SsAXL   PTGTEALKNLVIGGIGSVTVVDGSKVEASDLGNNFLLDEGCLGQPRAKSICSFLOELNDA

AtAXL  VKANFVEENPDTLISTDPSFFSQFTLVIAATQIVEDSMVKLDRICTEANVMVLARSYGIT
AtAXR1  VKAKFIEENPDTLITTNPSFFSQFTLVIAATQIVEDSMVKLDRICTEANVMVLARSYGIT
SsAXL   VKAKFVEEFPAHLIDSNPSFFSQFTLVIAATQIVEDSMVKLDRICTEANVMVLARSYGIT

AtAXL  GFVRI SVKEHTATETKPDHSLDDLRLNSPWPELKS YVESIDLNVVEEP-AAHKHTIPYVVIL
AtAXR1  GFVRI SVKEHPITIDSKPDHFLDDLRLNPNWPELKS FVETIDLNVSEPAAHKHIPYVVIL
SsAXL   GLVRVSVKEHCVIE SKPDHFLDDLRLNPNWPELKS QFAKSIDINDKDP-VVHKHTIPYIVIL

AtAXL  VKVAEEWAQHSGNLPSTREEKNEFKDLVKSMMVSADEENYKEALLAAFKVFPATGTSCE
AtAXR1  VKMAEEWAQHSGNLPSTREEKNEFKDLVKSMMVSTDEDNYKEAIEAAFKVFPATGTSSE
SsAXL   VRLAEKWADAHDGNMPSITRQEKNEFKDLIRAHMLNVDEENYKEAVDSSYKVSVPRI SNE

AtAXL  IQDINHDSCEAVGNSNSDFWVVAALKEFISNEGGEVPLEGSM PDMISSTEEHYINLQKI
AtAXR1  VQKLINDSCEAVGNSNSDFWVVAALKEFVNLNEGGEVPLEGSI PDMISSTEEHYINLQKI
SsAXL   IRQIIDDSCEAVGNSNSDFWVVAALKEFIAREGNGELPLEGTI PDMISLTETVYVSLQKI

AtAXL  YHSAEADFLSMEQRVKSTILVKVGDSSSTSKPTIKSFCKNARKLKVCRYRTIEDEEKSE
AtAXR1  YLAKAEADFLVIEERVKNILKKIGRDESSIPKPTIKSFCKNARKLKVCRYRMVEDEBRNP
SsAXL   YQAKAEFDCLALEHHVKEILKRIGRDESSISRAYIKTFCKNSRKLRVCRYRSEEEESSE

```

Figura 23 - Alinhamento da seqüência de proteína codificada pelo gene *AXL* de cana de açúcar (*Ss*) e seus homólogos em arabis (*At*). Caixas pretas representam a regiões conservadas

3.3.2 Acompanhamento visual e histológico da emergência da gema durante seus primeiros estágios de desenvolvimento

A emergência da gema lateral de cana de açúcar é um fator extremamente importante para o estabelecimento da cultura no campo. A emergência, ou brotação lateral, foi acompanhada visualmente durante seus primeiros estágios do desenvolvimento (Figura 24). No segundo dia após os colmos (contendo uma gema lateral) terem sido colocados para germinar, observou-se um considerável crescimento dos primórdios foliares (Figura 24). Este crescimento foi mantido durante toda a avaliação do experimento. O desenvolvimento das gemas indica que a dormência que impedia o crescimento do meristema apical e primórdios foliares formados na gema é quebrada após o corte do colmo e após este ser removido para condições ótimas de desenvolvimento. A liberação do estado de dormência ocorreu provavelmente devido a quebra da dominância do meristema apical da planta-mãe. Como mencionado no Capítulo 1 dessa dissertação, esse processo envolve uma gama complexa de respostas fisiológicas e moleculares, as quais incluem alterações na expressão gênica.

Figura 24 – Fotos representativas de gemas de cana de açúcar em diferentes estágios de desenvolvimento. (A) gema dormente presente em plantas intactas de aproximadamente oito meses de idade. (B-C) gemas em desenvolvimento após dois e cinco dias do plantio, respectivamente, em condições de casa de vegetação. Círculos vermelhos envolvem a gema

Com o intuito de observar diferenças anatômicas durante a brotação de gemas laterais, cortes histológicos longitudinais foram realizados e comparados entre gemas dormentes e gemas 5DAP. Nos cortes é possível evidenciar que o tipo e disposição dos primórdios foliares mudam na medida em que a gema começa a se desenvolver.

Na gema dormente, a maioria dos primórdios foliares são do tipo escama ou catafilos e estão dispostos formando uma hipérbole ao redor do meristema, fechando-o totalmente (Figura 25A). As escamas ou catáfilos geralmente apresentam estrutura de parede celular secundária mais espessa (setas escuras, Figura 25A). Tal estrutura, juntamente com a forma em que estão dispostas na gema, oferece proteção ao meristema. Já no caso da gema em desenvolvimento (5DAP), começam a ser formados primórdios foliares com capacidade fotossintética e estes estão dispostos em posição verticalizada em relação ao meristema, ou seja, começam a apresentar filotaxia do tipo alternada, o que é característico de várias monocotiledôneas (Figura 25B). Inicialmente, a gema lateral de cana germina com reservas energéticas contidas no colmo. Entretanto, a energia necessária para continuar o processo de desenvolvimento deverá ser proporcionada pela fotossíntese, fazendo-se indispensável à completa formação de folhas. As alterações morfológicas observadas neste contexto sugerem modificações complexas na resposta e sinalização de reguladores de crescimento bem como alterações na expressão de genes associados ao desenvolvimento das gemas laterais.

Figura 25 – Cortes histológicos longitudinais de gemas laterais de cana de açúcar em diferentes estágios de desenvolvimento. (A) gema dormente presente em plantas intactas de aproximadamente oito meses de idade. (B) gemas em desenvolvimento após cinco dias de plantio em condições de casa de vegetação. Setas brancas indicam a posição do meristema. Setas pretas indicam escamas ou catáfilos (primórdios foliares modificados para proteção, característicos da gema), diferenciadas por apresentarem tecidos vascularizados e parede celular espessa. Barra = 1mm

3.3.3 Geração de bibliotecas de pequenos RNAs expressos em gema axilar

Como mencionado nos itens anteriores, complexas modificações na expressão gênica parecem ocorrer durante o desenvolvimento da gema lateral. Tais modificações provavelmente envolvem regulação de expressão gênica em diversas “camadas”, incluindo a dos pequenos RNAs regulatórios. Com o intuito de identificar quais desses RNAs são expressos durante o desenvolvimento da gema lateral de cana, RNA total de gemas dormentes e gemas 2DAP foi extraído e utilizado na confecção de bibliotecas de pequenos RNAs. Foi decidido enviar o RNA total para a empresa suíça FASTERIS (www.fasteris.com), a qual é especializada em confecção de bibliotecas de cDNA/DNA para seqüenciamento utilizando o sistema SOLEXA/ILLUMINA.

As análises de bionformática foram realizadas pelo Dr. Renato Vicentini (CBMEG, UNICAMP), o qual vem colaborando frequentemente com nosso grupo de pesquisa. Essas análises tiveram por objetivo “minerar”, dentre milhões de seqüências geradas, aquelas que representam seqüências únicas de microRNAs conservados. Os parâmetros computacionais utilizados para identificar os miRNAs conservados foram similares aos descritos em Zanca et al. (2010).

A Tabela 5 apresenta o número e tamanho das seqüências totais geradas nas bibliotecas. Observou-se que várias classes de pequenos RNAs estão representadas nas bibliotecas, indicando a robustez da metodologia. A fração de pequenos RNAs mais enriquecida das bibliotecas está representada por RNAs de tamanho entre 18–26 nt, demonstrando a boa qualidade das mesmas (Tabela 5). Essa classe de pequenos RNAs contém seqüências de 19-22 nt, na qual está incluída a maioria dos miRNAs, além de seqüências de 24-26 nt, representando em sua grande maioria siRNAs associados a transposons e retrotransposons (rasiRNAs). (ZHU et al., 2008) reportaram que aproximadamente 94% dos RNAs seqüenciados em bibliotecas de pequenos RNAs de sementes de arroz apresentam um tamanho de 20–24 nt, sendo as classes de 21 e 24 nt as mais seqüenciadas. Esse dado é consistente com o fato de que precursores de miRNAs são processados normalmente pelas enzimas DCL1 ou DCL4 que produzem fragmentos de 21nt, diferente de rasiRNAs onde a clivagem é dirigida principalmente pela DCL3 produzindo fragmentos de 24 nucleotídeos (VAZQUEZ, 2006; VOINNET, 2009).

Tabela 5 - Distribuição do número total de *reads* de boa qualidade (*Phred score*) nas bibliotecas de pequenos RNAs

Tamanho do inserto (nt)	Gema	Gema
	Dormente	2 DAP
1-17	401.179	717.605
18-26	5.734.759	4.406.984
27-28	104.646	101.716
Total	6.240.584	5.226.305

A geração de bibliotecas de pequenos RNAs faz parte de um projeto piloto liderado pelo prof. Fabio TS Nogueira cujo objetivo é isolar e caracterizar microRNAs e seus genes-alvo em cana de açúcar. Os dados brutos das bibliotecas estão sendo organizados e analisados para identificação de miRNAs possivelmente específicos de cana-de-açúcar, além de rasiRNAs diferencialmente detectados nas distintas bibliotecas. Nosso grupo, em colaboração com o grupo do Dr. Renato Vicentini, está desenvolvendo *pipeline* para análise automática dos dados. Para esse trabalho, nós focamos somente na identificação de microRNAs conservados e análise da expressão de alguns selecionados, como descrito no item abaixo.

3.3.4 Identificação de miRNAs conservados expressos na gema

Após a análise computacional das bibliotecas de pequenos RNAs de gema dormente e 2DAP, foram obtidas 34.503 seqüências únicas (SQU) contendo ≥ 15 *reads* com tamanho entre 18–24 nt. O número de *reads* que compõe as seqüências únicas foi escolhido aleatoriamente. A grande quantidade de seqüências únicas obtidas sugere que pequenos RNAs podem ser moléculas-chave na regulação da dormência e brotação de gemas laterais em cana de açúcar, fenômeno caracterizado por complexas mudanças anatômicas e metabólicas.

Baseado na similaridade apresentada com seqüências de outras espécies depositadas no *miRBase* v.15, 191 das 34.503 SQUs foram consideradas como

potenciais seqüências maduras de miRNAs conservados em cana de açúcar. O baixo número de seqüências representado miRNAs previamente reportados em relação ao número total de SQUs é devido possivelmente ao fato de que a maioria dos pequenos RNAs seqüenciados representam diferentes classes de siRNAs, especialmente rasiRNAs, e não miRNAs. (XUE et al., 2008) analisaram a distribuição nos cromossomos de pequenos RNAs expressos em sementes em desenvolvimento de arroz, reportando que a maioria de pequenos RNAs são originados a partir de seqüências repetitivas intercaladas que consistem principalmente de elementos de transposição (TEs).

O genoma da cana é caracterizado por apresentar um grande número de TEs, os quais são considerados agentes mutagênicos e suas atividades produzem mudanças nas seqüências de genes, assim como rearranjos ao longo do genoma. Tais rearranjos podem alterar tanto a expressão quanto a função gênica (BENNETZEN, 2000). Organismos superiores tem desenvolvidos mecanismos de silenciamento transcricional e pós-transcricional de TEs mediado por pequenos RNAs (MATZKE et al., 2007; CHEN, 2009; TEIXEIRA et al., 2009). Esses dados, associados ao fato de que numerosas seqüências de siRNAs podem ser formadas a partir de um mesmo precursor, diferente do que ocorre com miRNAs (LU et al., 2005), esclarecem porque seqüências que não representam miRNAs são encontradas em maior abundância em bibliotecas de pequenos RNAs. Além disso, possíveis seqüências de novos miRNAs, que ainda não foram descritos ou são específicos de cana de açúcar, também formam parte das SQUs. Tais seqüências estão sendo analisadas em projetos em andamento no laboratório.

As 191 seqüências representando miRNA maduros conservado em cana de açúcar foram agrupadas em 25 famílias. Destas, quatro famílias foram identificadas somente em monocotiledôneas: miR444, miR529, miR1878 e miR1866 (Tabela 6). Das 14 famílias de miRNAs reportadas em cana de açúcar (ZANCA *et al.*, 2010; ZHANG et al., 2005), 11 também foram identificadas neste trabalho (miR156, miR159, miR166, miR167, miR168, miR169, miR319, miR396, miR399, miR408 e miR444). Membros de 13 famílias de miRNAs foram identificados adicionalmente para cana de açúcar nesta pesquisa. (Tabela 6).

Tabela 6 - miRNAs conservados expressos nas gemas axilares identificados a partir das bibliotecas de pequenos RNAs (continua)

Família	No. SQUs (isoformas)	Monocot específico?	Descrito em cana de açúcar?	Referencia
miR156	1	Não	Sim	(REINHART et al., 2002)
miR159	108	Não	Sim	(PALATNIK et al., 2003)
miR160	4	Não	Não	(REINHART et al., 2002)
miR162	2	Não	Não	(REINHART et al., 2002)
miR164	1	Não	Não	(REINHART et al., 2002)
miR166	17	Não	Sim	(REINHART et al., 2002)
miR167	3	Não	Sim	(LLAVE et al., 2002)
miR168	14	Não	Sim	(REINHART et al., 2002)
miR169	2	Não	Sim	(REINHART et al., 2002)
mir171	5	Não	Não	(LLAVE et al., 2002)
miR172	1	Não	Não	(PARK, LI et al., 2002)
miR319	10	Não	Sim	(PALATNIK et al., 2003)
miR393	2	Não	Não	(JONES-RHOADES; BARTEL, 2004)
miR394	1	Não	Não	(JONES-RHOADES; BARTEL, 2004)
miR395	1	Não	Não	(JONES-RHOADES; BARTEL, 2004)
miR396	4	Não	Sim	(JONES-RHOADES; BARTEL, 2004)
miR397	1	Não	Não	(JONES-RHOADES; BARTEL, 2004)
miR398	1	Não	Não	(JONES-RHOADES; BARTEL, 2004)
miR399	1	Não	Sim	(SUNKAR; ZHU, 2004)
miR408	1	Não	Sim	(SUNKAR; ZHU, 2004)

Tabela 6 - miRNAs conservados expressos nas gemas axilares identificados a partir das bibliotecas de pequenos RNAs (conclusão)

Família	No. SQUs (isoformas)	Monocot específico?	Descrito em cana de açúcar?	Referencia
miR444	3	Sim	Sim	(SUNKAR, 2005)
miR529	2	Sim	Não	(ZHU et al., 2008)
miR529*	1	Sim	Não	(ZHU et al., 2008)
miR827	3	Não	Sim	(RAJAGOPALAN et al., 2006)
miR1878	1	Sim	Não	(RAJAGOPALAN et al., 2006)
miR1866	1	Sim	Não	(RAJAGOPALAN et al., 2006)

Dentre os miRNAs conservados identificados neste estudo, o miR159 parece ser o mais abundante em gemas laterais de cana de açúcar (108 SQUs, Tabela 6). O número de SQUs é quase sete vezes maior que o segundo mais abundante, o miR166 (17 SQUs, Tabela 6). Essa abundância pode refletir o papel regulatório desse miRNA durante o desenvolvimento da gema lateral. Tal papel, e também de outros miRNAs, será discutido na seção abaixo.

O número elevado de isoformas observado para o miR159 e outros miRNAs,, além de refletir o nível de expressão, pode também refletir o nível de ploidia da cana de açúcar. Alinhamento das 108 SQUs do miR159 (dados não mostrados) sugere a presença de *Single-nucleotide polymorphisms* (SNPs), bem como *indels* (inserções/deleções). Isto pode ser devido ao número elevado de alelos de cada locus de híbridos comerciais de cana (LAKSHMANAN et al., 2005).

3.3.5 Análise de expressão gênica e acúmulo de miRNAs maduros nas etapas iniciais da emergência de gemas axilares em cana de açúcar

A brotação lateral vegetativa é um complexo processo que incia-se no momento em que as gemas axilares dormentes tornam-se ativas, promovendo a formação de estruturas similares a aquelas que são formadas a partir do meristema apical (LEYSER,

2009). No caso da cultura de cana de açúcar, a capacidade das gemas axilares para formar uma nova planta é usada na propagação vegetativa. Desta forma, os indivíduos geneticamente idênticos, ou clones, podem ocupar uma ampla área. Embora tenha-se amplo conhecimento de que mudanças anatômicas e metabólicas ocorrem durante a emergência (ou germinação) das gemas axilares, pouco é conhecido sobre as bases fisiológicas e moleculares características deste processo.

Com o intuito de detectar modificações na expressão gênica de genes previamente associados ao processo de brotação lateral, assim como alguns miRNAs cuja expressão foi detectada nas bibliotecas de gemas axilares (Tabela 6), foi selecionado grupo de genes candidatos (Tabela 4) e sua expressão foi monitorada via RT-qPCR em gemas dormentes, 2DAP e 5DAP. Os resultados indicam que a emergência de gemas axilares em cana de açúcar é um processo dinâmico, no qual fitohormônios e miRNAs parecem ser fatores importantes que contribuem para esta fase do desenvolvimento inicial de cana de açúcar.

Devido ao número de genes avaliados e as funções que eles representam, os resultados e suas interpretações são apresentados separadamente.

3.3.5.1 Perfil de expressão do gene *Ssknotted1*

Homólogos do gene *SsKnotted1* (Figura 20) são fatores de transcrição do tipo *homeobox*, da subfamília KNOX classe I, associados ao estabelecimento e organização dos meristemas apicais e axilares (SENTOKU et al., 1999; VOLLBRECHT; REISER; HAKE, 2000). Esta característica permite que este gene seja utilizado como marcador para detectar a formação de novos meristemas durante o desenvolvimento da gema axilar.

Neste trabalho, os níveis de transcritos do gene *SsKnotted1* aumentaram em gemas em desenvolvimento (aproximadamente três vezes em gemas 2DAP e 5DAP (Figura 26). Este aumento em sua expressão pode ser atribuído ao fato de que novos meristemas axilares ou regiões meristemáticas estão sendo formadas nas axilas dos primórdios foliares, como consequência do início da diferenciação dos primórdios em folhas, o que ocorre quando o crescimento das gemas é ativado (Figura 25). A

formação de meristemas laterais nas axilas das folhas faz parte do normal desenvolvimento da arquitetura vegetal (WANG; LI, 2008).

Estes resultados estão em concordância com o reportado por (OIKAWA; KYOZUKA, 2009). Os autores mostraram que, embora a expressão do gene *OsOSH1* (homólogo em arroz do *SsKnotted1*) fosse detectada na região adaxial da axila do quarto primórdio foliar, esta se faz maior nos primórdios subseqüentes, devido ao aumento da proliferação celular na região onde o meristema axilar está sendo formado.

Figura 26 – Perfil de expressão relativa do gene *SsKnotted1* durante a emergência da gema axilar. Um *pool* de cinco gemas foi coletado para cada estágio. O nível do transcrito é representado como uma razão (expressão relativa) do valor absoluto da expressão do *SsKnotted1* pelo valor absoluto da expressão do gene normalizador *Ribossomal 25S* (TC148086). Barras verticais representam o desvio padrão de duas amostras biológicas. (DAP) dias após o plantio

3.3.5.2 Perfil de expressão do gene *Sstb1*

Com o intuito de confirmar a quebra da dominância apical ao nível molecular, foi avaliada a expressão do gene *Sstb1* nas gemas dormentes e gemas em desenvolvimento. O *tb1* é um dos membros fundadores da família de fatores de transcrição do tipo TCP (*TEOSINTE BRANCHED1*, *CYCLOIDEA*, e *PCF*), os quais participam de diversos aspectos do desenvolvimento vegetal (CUBAS et al., 1999).

Embora sua expressão não seja específica de gemas axilares, o gene *tb1* é preferencialmente expresso neste órgão, sendo sua repressão nas gemas axilares associada a ativação das mesmas (HUBBARD et al., 2002; AGUILAR-MARTINEZ; POZA-CARRION; CUBAS, 2007).

Interessantemente, neste trabalho, foi observado um modesto aumento no acúmulo de transcritos do *tb1* durante o período avaliado de desenvolvimento da gema axilar de cana (Figura 27), mas não sua repressão. Este intrigante resultado sugere alguns possíveis cenários moleculares que podem ocorrer durante o período avaliado de desenvolvimento da gema.

Um primeiro cenário, ou hipótese, é que a repressão do gene *Sstb1* não é um fator crucial para a indução de quebra de dormência e desenvolvimento de gemas axilares em cana-de-açúcar. Essa hipótese é suportada por dados de *quantitative trait loci* (QTL) obtidos por Aitken et al. (2008). Os autores concluem que, diferentemente do que ocorre em milho e em arroz, o gene *tb1* de cana de açúcar possui efeito negligenciável e variável na formação de brotos laterais. O mesmo foi observado para a espécie vegetal parente do milho, a foxtail millet (*Setaria italica*) (DOUST et al., 2004).

Outra hipótese seria de que o resultado observado é devido ao fato de que as análises de expressão gênica realizadas nesse trabalho foram feitas em gemas axilares em desenvolvimento separadas do resto da planta (exceto no caso de gemas dormentes), anexadas somente ao colmo, parte do caule utilizado na propagação vegetativa de cana de açúcar (Figura 17). É provável que outras vias genéticas, independentes de *tb1*, direcionem a emergência da gema axilar nestas condições.

Além disso, a maioria das pesquisas em que foi mostrado o papel regulatório do *tb1* na brotação lateral foram realizadas com plantas inteiras, ou seja, todo o desenvolvimento foi avaliado em gemas axilares anexadas a planta-mãe. Não temos conhecimento de experimentos similares aos realizados neste trabalho, no qual se avalia a expressão de genes em gemas após plantio em substrato, o que é uma prática comercial comum e extremamente importante para a cana de açúcar. Adicionalmente, foi mostrado que a expressão do gene *tb1* não é modificada em todas as situações em que é afetada a brotação lateral. Em sorgo, por exemplo, a expressão do gene *tb1* aumenta em plantas sob condições de sombra e alta densidade, sendo este aumento

correlacionado com a manutenção da dormência de gemas axilares. Entretanto, no caso de plantas que apresentam também aumento da dormência de gemas axilares causada por desfoliamento, esta correlação não é evidente (KEBROM; BURSON; FYNALYSON, 2006; KEBROM; BRUTNELL; FINLAYSON, 2010). Baseado nas observações mencionadas, juntamente com os resultados obtidos neste trabalho, propõe-se que o gene *Sstb1* está envolvido em alguns, mas não em todas as vias genéticas que regulam a brotação lateral.

Figura 27 – Perfil de expressão relativa do gene *Sstb1* durante a emergência da gema axilar. Um *pool* de cinco gemas foi coletado para cada estágio. O nível do transcrito é representado como uma razão (expressão relativa) do valor absoluto da expressão do *Sstb1* pelo valor absoluto da expressão do gene normalizador *Ribossomal 25S*. Barras verticais representam o desvio padrão de duas amostras biológicas. (DAP) dias após o plantio

Outra hipótese que pode ser considerada em relação ao resultado observado, é que a regulação negativa do gene *Sstb1* ocorreu imediatamente após a gema ter sido retirada da planta e colocada em condições ideais de crescimento, ou seja, num período menor de tempo do que o período avaliado nesse trabalho. Tal regulação pode sinalizar para que a gema subsequente inicie sua emergência (HUBBARD et al., 2002; AGUILAR-MARTINEZ; POZA-CARRION; CUBAS, 2007). O modesto aumento no acúmulo de transcritos do *Sstb1* ou a manutenção de sua expressão basal (em 2DAP e 5 DAP) pode ter por objetivo a manutenção da dormência de meristemas que estão

sendo formados nas axilas dos primórdios foliares das gemas, como indicado pelo aumento da expressão do *Ssknotted1* (Figura 26). Para testar esta hipótese, é necessário que sejam feitos futuros experimentos em que a expressão do *Sstb1* seja monitorada em diferentes tempos imediatamente após o corte do colmo. É necessária também a avaliação de sua expressão espacial na gema dormente e em desenvolvimento, utilizando-se técnicas de hibridação *in situ*.

3.3.5.3 Perfil de expressão do gene *SsERF3*

Com o objetivo de verificar-se ao nível de regulação gênica qual é o comportamento do fitohormônio etileno (ETH) durante a emergência de gemas axilares em cana de açúcar, foi avaliada a expressão do gene *SsERF3* nas gemas dormentes e em desenvolvimento. O gene *SsERF3* faz parte da superfamília *ERF* (fatores de resposta ao ETH), os quais são fatores de transcrição específicos de plantas que atuam no último passo da via de sinalização de etileno. Genes *ERF* estão envolvidos em processos do desenvolvimento, regulação do metabolismo, e resposta a estresses abióticos e bióticos (VAN DER FITS; MEMELINK, 2000; BANNO et al., 2001; TRUJILLO et al., 2008).

Neste trabalho, a expressão do *SsERF3* foi maior na gema dormente do que em gemas em desenvolvimento (2DAP e 5DAP), nas quais é observado progressiva repressão de sua expressão (Figura 28). (TRUJILLO et al., 2008) reportaram que a expressão do gene *SsERF3* é induzida rapidamente em plantas tratadas com Ethephon (ácido 2-cloro-etil fosfônico), o qual induz a liberação de etileno quando colocado em contato com o tecido vegetal. Este fato sugere que a redução no acúmulo de transcritos do gene *SsERF3* pode ter sido causada por alterações na via de sinalização ou diminuição nos níveis de ETH após o início da emergência da gema.

Figura 28 – Perfil de expressão relativa do gene *SsERF3* durante a emergência da gema. Um *pool* de cinco gemas foi coletado para cada estágio. O nível do transcrito é representado como uma razão (expressão relativa) do valor absoluto da expressão do *SsERF3* pelo valor absoluto da expressão do gene normalizador “*Ribossomal 25S*”. Barras verticais representam o desvio padrão de duas amostras biológicas. (DAP) dias após o plantio

Tem sido mostrado por vários trabalhos que aplicações de Ethephon (indutor de ETH) podem melhorar a capacidade de germinação das gemas axilares de cana de açúcar (LI; SOLOMON, 2003). Porém, baseado nos resultados da expressão do *SsERF3* (Figura 27 acima), possivelmente os altos níveis de ETH estejam associados à quebra da dormência da gema e não a processos de crescimento e expansão celular que ocorrem após que o desenvolvimento da gema ter sido ativado (Figura 27).

É conhecido que ETH inibe o crescimento de maneira antagônica ao ácido giberélico (GA) e esta inibição do crescimento pode ser mediada em parte pela regulação positiva que o ETH exerce sobre as proteínas DELLA, caracterizadas por regular negativamente a via de sinalização de GA (ACHARD et al., 2003). Interessantemente, um dos alvos das proteínas DELLA é o gene *GAMyB*, o qual é um componente importante na ativação de genes de resposta ao GA (GUBLER et al., 2002).

Portanto, o aumento de expressão do gene *SsGAMyB* durante a emergência da gema axilar de cana de açúcar (discutido nos próximos itens) pode ser favorecida pela diminuição nos níveis de ETH; a queda na produção de ETH ou uma alteração negativa da via de sinalização deste fitohormônio pode levar conseqüentemente a uma diminuição da proteína DELLA, a qual regula negativamente a expressão do *SsGAMYB* (mostrado nos próximos itens).

3.3.5.4 Perfil de expressão do gene *SsAXL* e *SsPIN1*

O fitohormônio auxina está implicado em vários processos do desenvolvimento dos vegetais, incluindo divisão celular, alongação celular, diferenciação vascular, iniciação de raízes e dominância apical (REINHARDT et al., 2000; BENKOVÁ et al., 2003; LEYSER, 2009). Com o intuito de identificar seu comportamento ao nível molecular durante a emergência das gemas, foi avaliada a expressão dos genes *SsAXL* e *SsPIN1*, os quais fazem parte do processo de transdução de sinal e transporte de auxina, respectivamente.

A expressão do *SsAXL* apresentou uma indução de seis vezes nas gemas 2DAP e cinco vezes nas gemas 5DAP (Figura 29). Tais incrementos podem refletir aumento dos níveis de auxina na gema em desenvolvimento. O gene *SsAXR1* codifica para a enzima E1 do complexo de ativação de ubiquitinação, a qual é necessária para degradação de proteínas na via de sinalização de auxina (LEYSER, 2006; DHARMASIRI et al., 2007). Mutantes de *arabidopsis axr1* são resistentes a auxina, apresentado fenótipos pleiotrópicos (LINCOLN; BRITTON; ESTELLE, 1990), evidenciando portanto o papel fundamental deste gene na via de sinalização de auxina.

Um possível aumento na produção de auxina é esperado, já que maiores níveis deste fitohormônio são requeridos em gemas em desenvolvimento para promover diferentes processos associados à formação da nova planta, como por exemplo, formação de primórdios foliares. Possivelmente esta auxina está sendo produzida nas folhas em expansão e no meristema axilar ativado, o qual após sair do estado dormente converte no meristema apical da nova planta. Ljung, Bhalerao e Sandberg (2001) reportaram que auxina é produzida principalmente em folhas jovens e no meristema apical durante o desenvolvimento vegetativo.

Além disso, a auxina pode interagir ao nível de regulação gênica e de proteínas com outros fitohormônios como o GA durante o desenvolvimento de gemas axilares. Por exemplo, as proteínas DELLA podem ser afetadas por um incremento da concentração de auxina nas gemas em desenvolvimento. Embora os mecanismos não estejam claros, existem indícios da desestabilização de algumas DELLA mediada via auxina (FU; HARBERD, 2003). Tal desestabilização pode favorecer a expressão do gene *SsGAMyB* durante o desenvolvimento de gemas axilares em cana de açúcar (ver no próximo item).

Figura 29 – Perfil de expressão relativa do gene *SsAXR1* durante a emergência da gema. Um *pool* de cinco gemas foi coletado para cada estágio. O nível do transcrito é representado como uma razão (expressão relativa) do valor absoluto da expressão do *SsAXR1* pelo valor absoluto da expressão do gene normalizador "*Ribossomal 25S*". Barras verticais representam o desvio padrão de duas amostras biológicas. (DAP) dias após o plantio

Surpreendentemente, o acúmulo de transcritos do gene *SsPIN1* foi severamente reduzido após 5 dias de emergência das gemas de cana de açúcar. Como observado na Figura 30, a expressão do *SsPIN1* foi similar em gemas dormentes e gemas 2DAP, mas reduzida cerca de cinco vezes em gemas 5DAP. Homólogos do *SsPIN1* são membros da família de transportadores de efluxo de auxina, (GÄLWEILER et al., 1998)

cuja expressão é induzida por este fitohormônio (HEISLER et al., 2005; VIETEN et al., 2005).

Um aumento na expressão deste gene seria esperada, já que a auxina que é produzida principalmente nas folhas em expansão e no meristema caulinar da planta (formados a partir da gema), precisa ser distribuída para os demais locais do ápice vegetativo. Além disso, foi relatado que a expressão do gene *PIN1* é necessária durante a formação dos novos primórdios foliares, os quais estão surgindo no meristema das gemas em desenvolvimento (Figura 25) (HEISLER et al., 2005).

Uma possível explicação para o resultado encontrado neste trabalho é que o *SsPIN1* não é um dos transportadores de efluxo que está diretamente associado com o transporte de auxina durante a emergência da gema axilar. Entretanto, a identificação de todos os membros da família gênica *PIN* de cana é dificultada pelo fato de que seu genoma não se encontra totalmente seqüenciado.

Figura 30 – Perfil de expressão relativa do gene *SsPIN1* durante a emergência da gema. Um *pool* de cinco gemas foi coletado para cada estágio. O nível do transcrito é representado como uma razão (expressão relativa) do valor absoluto da expressão do *SsPIN1-like* pelo valor absoluto da expressão do gene normalizador "*Ribossomal 25S*". Barras verticais representam o desvio padrão de duas amostras biológicas. (DAP) dias após o plantio

A família de genes *PIN* é caracterizada por apresentar vários membros com diferentes padrões de expressão. O genoma de *Arabidopsis* possui oito genes *PIN* e cada membro apresenta um padrão de expressão específico (BENKOVÁ et al., 2003; BLILOU et al., 2005; PAPONOV et al., 2005). Em arroz também foi demonstrado, via RT-PCR e expressão do gene repórter *GUS*, que embora os nove genes *PIN* testados sejam expressos constitutivamente na planta, estes apresentam diferenças no padrão de expressão. O mesmo trabalho também relata que dois dos nove genes *PIN* avaliados não são regulados positivamente por aplicações exógenas de auxina (WANG et al., 2009). Baseado no que foi anteriormente exposto, é possível argumentar que, semelhantemente a *Arabidopsis* e arroz, o genoma de cana-de-açúcar tenha um número variado de genes *PIN* com diferentes padrões de expressão espacial e temporal nos diferentes tecidos e órgãos da planta, incluindo a gema axilar. Experimentos futuros incluirão a análise da expressão espacial do *SsPIN1* em gemas dormentes e em desenvolvimento via hibridação *in situ*.

3.3.5.5 Perfil de expressão do gene *SsGAMyB* e acúmulo de seus regulares, os microRNAs *SsmiR159* e *SsmiR319*

Os genes *GAMyB* ou *GAMyB-like* são fatores de transcrição implicados em processos de transdução de sinal de GA (WOODGER et al., 2003). Interessantemente, o gene *SsGAMyB* apresenta sítio de regulação reconhecido tanto pelo *SsmiR159* quanto pelo *SsmiR319* (Figura 31), cuja expressão foi identificada nas bibliotecas de pequenos RNAs das gemas axilares de cana-de-açúcar, sendo o *SsmiR159* o mais seqüenciado dentre os miRNAs encontrados nas bibliotecas (Tabela 6).

Figura 31 - Sítio do transcrito do gene *SsGAMyB* complementar aos microRNAs *SsmiR159* e *SsmiR319*. O pareamento Watson-Crick (linhas verticais) é indicado

Na Figura 32 são mostrados os resultados da análise de expressão do *SsGAMyB*, *SsmiR319* e *SsmiR159*. A expressão do gene *SsGAMyB* foi induzida mais de 3 vezes em gemas 2DAP e 5DAP em relação as gemas dormentes. A indução do *SsGAMyB* é negativamente correlacionada com o padrão de acúmulo do *SsmiR159*, tanto em gemas 2DAP como em gemas 5DAP. No caso do *SsmiR319*, é observada correlação negativa somente em gemas 5DAP. Como mencionado em Materiais e Métodos, os iniciadores utilizados para detectar os transcritos do *SsGAMyB* foram desenhados flanqueando o sítio de reconhecimento desses miRNAs, indicando que somente transcritos intactos de *SsGAMyB* foram detectados por RT-qPCR.

Figura 32 – Perfil de expressão relativa dos genes *SsGAMyB*, *SsmiR319*, *SsmiR159*, durante a emergência da gema. Um *pool* de cinco gemas foi coletado para cada estágio. O nível do transcrito é representado como uma razão (expressão relativa) do valor absoluto da expressão do gene de interesse pelo valor absoluto da expressão do gene normalizador "*Ribossomal 25S*". Barras verticais representam o desvio padrão de duas amostras biológicas. (DAP) dias após o plantio

Estes dados indicam que o gene *SsGAMyB* é regulado, pelo menos em parte, pelos *SsmiR159* e *SsmiR319* durante o desenvolvimento de gemas laterais. Interessantemente, a maioria das seqüências identificadas do *SsmiR159* foram

provenientes de bibliotecas de pequenos RNAs advindos de gemas dormentes (dados não mostrados). Esse dado, aliado ao fato de que seu acúmulo é severamente reduzido nas gemas em desenvolvimento, sugere que o gene *SsGAMyB* é predominantemente regulado em gemas dormentes pelo SsmiR159 (Figura 32).

A regulação do gene *SsGAMyB* por miRNAs foi corroborada por meio da técnica 5'RACE, que permite analisar os fragmentos clivados de genes alvo de miRNAs. Na figura 33 é mostrada imagem do gel de agarose contendo os transcritos clivados (260 pb) do gene *SsGAMyB* em gemas dormentes e em desenvolvimento, indicando que o gene *SsGAMyB* está sendo regulado pós-transcricionalmente durante o desenvolvimento da gema axilar em cana de açúcar. Futuramente, os *amplicons* gerados serão seqüenciados para confirmar sua identidade e determinar qual é o nucleotídeo exato em que o gene *SsGAMyB* esta sendo clivado.

Figura 33 – Produto de 5'RACE PCR do gene *SsGAMyB* e produto de PCR do gene *Ribossomal 25S* usado como controle da reação. L: 1Kb plus DNA ladder. 0: Gema dormente. DAP: Dias após o plantio

Similar ao encontrado nesta pesquisa, foi mostrado em *arabidopsis* e arroz que a expressão de genes *GAMyB-like* é regulada pelo miR159 em sementes e anteras (TSUJI et al., 2006; REYES; CHUA, 2007; ALONSO-PERAL et al., 2010). Recentemente, Barroso (2010) relatou que o gene *SsGAMyB* é regulado negativamente

pelo miR319 em plantas de cana de açúcar submetidas a estresse por baixas temperaturas.

GA e o ácido abscísico (ABA) são fitohormônios correlacionados com a regulação de numerosos processos do desenvolvimento. Um exemplo é o que acontece na germinação de sementes, em que altos níveis de GA e baixos de ABA favorecem a germinação. Por outro lado, condições desfavoráveis para a germinação são associadas com baixos níveis de GA e altos de ABA (NAMBARA; MARION-POLL, 2005; PISKUREWICZ et al., 2008). Recentes pesquisas indicam o envolvimento da via miR159/*GAMyB* durante a germinação, a qual parece ser regulada pelos níveis endógenos de GA e ABA. (REYES; CHUA, 2007) reportaram que os níveis de acúmulo do miR159 aumentam consideravelmente em sementes de *arabidopsis* durante a germinação quando estas são tratadas com ABA, levando a uma diminuição na eficiência na germinação, causada talvez pela redução na expressão dos genes *GAMYB-like*, já que estes são regulados de maneira pós-transcricional pelo miR159 (Figura 32). Genes *GAMyB* regulam um amplo grupo de genes de resposta a GA, pois estes fatores de transcrição interagem com elementos em *cis* do tipo GARE (elemento de resposta a GA), os quais estão presentes na região promotora de seus genes alvo (GUBLER et al., 1995). Vários desses genes alvo estão associados ao crescimento e expansão celular (TSUJI et al., 2006; ALONSO-PERAL et al., 2010).

Baseado nos resultados obtidos por nós e outros grupos, é possível sugerir que os processos moleculares que ocorrem durante a emergência inicial de gemas axilares de cana são regulados de maneira análoga à germinação de sementes: a redução no acúmulo de transcritos do miRNA159, talvez associada a diminuição nos níveis de ABA, favorece o acúmulo de transcritos do *SsGAMyB*, que, por sua vez, pode induzir a expressão de genes de resposta a GA. Tais genes são necessários para que a emergência da gema axilar de cana de açúcar ocorra. Para confirmar tal hipótese, os níveis de GA, ABA e outros fitohormônios serão quantificados em gemas dormentes e em desenvolvimento por meio de técnica de espectrometria de massa.

Durante a germinação de sementes, genes *GAMyB* induzem a produção de enzimas hidrolíticas na camada de aleurona em resposta a GA (GUBLER et al., 1999; ALONSO-PERAL et al., 2010). Estas enzimas são responsáveis pela hidrólise das

reservas do endosperma, principalmente amido e proteína. Os produtos hidrolisados são posteriormente transportados para o embrião em crescimento. Embora gemas axilares de cana de açúcar não apresentem estrutura similar a uma semente, a maior expressão do gene *SsGAMyB* em gemas em desenvolvimento pode estar associada a uma maior produção de enzimas hidrolíticas, necessárias para realizar o catabolismo de moléculas de reserva armazenadas principalmente no colmo (Figura 17), fornecendo os nutrientes e energia necessários para que a gema possa iniciar sua emergência. Esta reserva de energia é crucial para a gema porque, nesta fase do desenvolvimento, a plântula em formação não conta com órgãos propriamente formados, como folhas e raízes, que lhe permitam realizar processos fotossintéticos e absorver nutrientes do meio externo, respectivamente.

3.3.5.6 Perfil de expressão do gene *SsSPL1* e acúmulo do *SsmiR156* e *SsmiR529*

O gene *SsSPL1* é membro da família de fatores de transcrição do tipo *SQUAMOSA (SQUA) promoter-binding-protein (SPL)*, a qual é específica de plantas. Genes *SPL* são reportados como importantes reguladores do crescimento e desenvolvimento dos vegetais (CHEN et al., 2010). Homólogos do *SsSPL1* (Figura 10 no capítulo 2) têm sido associados à regulação da arquitetura da planta. Em *arabidopsis*, dois possíveis genes parálogos *AtSPL9* e *AtSPL15*, ortólogos do *SsSPL1*, atuam de maneira redundante no controle do tempo de formação dos primórdios foliares (*plastochron*) e controle da brotação lateral (SCHWARZ et al., 2008). Vários membros da família *SPL*, incluindo a *SsSPL1*, são regulados pós-transcricionalmente pelo miR156. Foi reportado que a superexpressão do miR156 promove severa redução na dominância apical em *arabidopsis*, arroz, milho e tomateiro (SCHWAB et al., 2005; XIE; WU; XIONG, 2006; CHUCK et al., 2007); Silva et al., dados não publicados), levando a uma maior produção de ramos laterais, evidenciando a importância da via miR156/*SPL* na regulação da brotação lateral. Interessantemente, o sítio de reconhecimento do miR156 é sobreposto pelo sítio de reconhecimento do miR529 em transcritos do *SsSPL1* (Figura 34), sugerindo que ambos miRNAs regulam esse gene. Diferentemente do miR156, o miR529 parece ser específico de monocotiledôneas,

embora regule os mesmos genes-alvo em monocots e dicots (SILVA et al., dados não publicados).

Figura 34 - Sítio do transcrito do gene *SsSPL1* complementar aos microRNAs *SsmiR156* e *SsmiR529*. O pareamento Watson–Crick (linhas verticais) é indicado

Nas bibliotecas de pequenos RNAs de gemas foi detectada a expressão do miR156 e miR529 (Tabela 6), sugerindo que estes miRNAs modulam a expressão de seus alvos nos diferentes estágios do desenvolvimento das gemas axilares. Com o intuito de avaliar o comportamento deste miRNAs durante a emergência da gemas axilares, foi monitorado seu acúmulo, assim como a expressão do gene *SsSPL1* (Figura 35).

O gene *SsSPL1* é induzido cerca de 2 vezes nas gemas em desenvolvimento, em relação as gemas dormentes. Esse aumento é correlacionado negativamente com o acúmulo do miR529, cuja expressão é reduzida nas gemas em desenvolvimento, sendo a redução em seu acúmulo mais evidente em gemas 5DAP (supressão de 5 vezes). No caso do miR156, não observou-se correlação negativa com a expressão do gene *SsSPL1* (Figura 35). Esse resultado é diferente do encontrado quando comparou-se o acúmulo desse miRNA e *SsSPL1* em diferentes órgãos vegetais de cana (Figura 11 do capítulo 2).

Figura 35 – Perfil de expressão relativa dos genes *SsSPL1*, *SsmiR156*, *SsmiR529*, durante a emergência da gema. Um *pool* de cinco gemas foi coletado para cada estágio. O nível do transcrito é representado como uma razão (expressão relativa) do valor absoluto da expressão do gene de interesse pelo valor absoluto da expressão do gene normalizador “*Ribossomal 25S*”. Barras verticais representam o desvio padrão de duas amostras biológicas. (DAP) dias após o plantio

Levando em consideração a expressão dessa *SPL* e os dois miRNAs é possível sugerir que, em gemas axilares, a expressão do *SsSPL1* é predominantemente modulada pelo miR529; o aumento no acúmulo de transcritos intactos do gene *SsSPL1* nas gemas em desenvolvimento é causada, pelo menos em parte, pela diminuição do acúmulo do miR529. Tal como para o gene *SsGAMyB*, os iniciadores utilizados para detectar transcritos do *SsSPL1* foram localizados em regiões flanqueando o sítio de reconhecimento do miR156 e miR529. (CHUCK et al., 2010) relatam que o gene *tassel/sheath4*, membro da família *SPL* de milho, embora seja regulado conjuntamente pelo miR156 e miR529, é modulado diferencialmente por cada um deles durante o desenvolvimento da inflorescência. O fato de que um mesmo gene possa ser regulado por miRNAs diferentes, oferece vantagens para modular sua expressão, já que um número maior de vias são disponíveis. Em cana de açúcar, o gene *SPL1* parece ser

regulado pelo miR156 em tecidos foliares (Figura 11 do capítulo 2) e em gemas axilares pelo miR529.

Baseado nos dados de RT-qPCR, sugere-se que a proteína *SsSPL1* pode ser mais necessária em gemas em desenvolvimento para garantir a dormência dos meristemas axilares que estão sendo formados nas axilas dos primórdios foliares em desenvolvimento. O ortólogo da *SsSPL1* em arroz (*OsSPL14*) tem sido associado ao controle da formação de órgãos laterais, sendo sua expressão detectada predominantemente em ápices vegetativos e nos primórdios de órgãos laterais; de fato, mudanças no padrão expressão de *SPLs* levam a alterações dramáticas na arquitetura vegetativa de dicots e monocots (SCHWARZ et al., 2008; JIAO et al., 2010; SILVA et al., dados não publicados).

Para confirmar a regulação pós-transcricional do gene *SsSPL1* na gema, foi utilizada a técnica 5'RACE tal como descrito em Material e Métodos. Na Figura 36 é mostrado os transcritos clivados do gene *SsSPL1*, na qual é evidenciado um *amplicom* no tamanho esperado (140 – 145pb). Futuramente, o *amplicom* será seqüenciado com o intuito de confirmar sua identidade e determinar o ponto exato em que o *SsSPL1* esta sendo clivado, permitindo inferir qual dos dois miRNAs (miR156 ou miR529) tem maior participação na regulação deste alvo, já que eles apresentam complementaridade com o *SsSPL1* em regiões diferentes (Figura 34).

Figura 36 – Produto de 5'RACE PCR do gene *SsSPL1* e produto de PCR do gene *Ribossomal 25S* usado como controle da reação. L: 1Kb plus DNA ladder. 0: Gema dormente. DAP: Dias após o plantio

3.3.5.7 Perfil de expressão do gene *SsDCL1*

Com o objetivo de avaliar se as mudanças observadas no acúmulo de miRNAs maduros durante a fase da emergência da gema estão influenciadas por mecanismos do seu processamento, foi avaliada a expressão do gene *SsDCL1*. ortólogos do gene *SsDCL1* (Figura 37) codificam a principal enzima envolvida no processamento dos precursores de miRNAs. Alterações na expressão de *DCL1* afetam diretamente o acúmulo de miRNAs maduros (XIE et al., 2003).

Os resultados da análise de expressão do gene *SsDCL1* mostram um comportamento similar tanto em gemas dormentes como em gemas ativas (Figura 37). Este fato indica que as mudanças no acúmulo de miRNAs nesta fase do desenvolvimento são causadas principalmente pela regulação transcricional dos genes *MIR* (NOGUEIRA et al., 2009). Genes *MIR* são transcritos pela RNAPolIII, sendo sua transcrição controlada por mecanismos similares aos que governam a regulação de genes que codificam para proteínas. Estes mecanismos envolvem principalmente ativação ou repressão via fatores de transcrição, proteínas remodeladoras de cromatina, modificações de histona e metilação de DNA (CHEN, 2009). Porém o acúmulo de miRNAs pode também ser alterado em outras fases da sua biogênese, onde *SsDCL1* não está envolvida (NOGUEIRA et al., 2009).

Figura 37 – Perfil de expressão relativa do gene *SsDCL1* durante a emergência da gema. Um *pool* de cinco gemas foi coletado para cada estágio. O nível do transcrito é representado como uma razão (expressão relativa) do valor absoluto da expressão do *SsDCL1* pelo valor absoluto da expressão do gene normalizador "*Ribossomal 25S*". Barras verticais representam o desvio padrão de duas amostras biológicas. (DAP) dias após o plantio

Nosso grupo de pesquisa identificou vários precursores de miRNAs de cana de açúcar (ZANCA et al., 2010). Experimentos futuros serão realizados para avaliar o acúmulo dos precursores de alguns miRNAs durante o desenvolvimento de gemas axilares (ex. precursores do miR159), com o intuito de estudar sua regulação durante essa importante fase de desenvolvimento de cana de açúcar.

3.4 Conclusões

Com base nos resultados apresentados, conclui-se que:

- Baseado dos dados das bibliotecas de pequenos RNAs geradas, sugere-se que essas moléculas possuem papel importante na regulação da emergência da gemas axilares.

- MicroRNAs pertencentes a 25 famílias conservadas em diferentes espécies vegetais são expressos em gemas axilares de cana de açúcar.
- Foram identificados e caracterizados diferentes genes associados à brotação lateral e resposta hormonal que poderão ser usados futuramente como genes controles em estudos fisiológicos e de desenvolvimento de cana de açúcar a nível molecular. .
- Novas regiões meristemáticas são formadas durante a emergência de gemas axilares.
- Durante a emergência da gemas axilares em cana de açúcar, processos de transdução de sinal associados aos fitohormônios GA e Auxina são ativados, enquanto que para o fitohormônio ETH são reprimidos.
- O gene *tb1* de cana de açúcar parece não ser determinante na quebra da dominância apical de gemas axilares separadas do resto da planta, anexadas somente ao colmo.
- O gene *SsGAMyB* é regulado, pelo menos em parte, pelos SsmiR159 e SsmiR319 durante o desenvolvimento de gemas axilares.
- Altos níveis de *SsGAMyB* parecem ser importantes para modular a via de sinalização de GA durante a emergência de gemas axilares de cana de açúcar.

- O gene *SsSPL1* é regulado pelo SsmiR529 e o SSmiR156, mas sua expressão durante o desenvolvimento de gemas axilares parece ser modulada pelo SsmiR529.
- Aumento da expressão do gene *SsSPL1* durante o desenvolvimento de gemas axilares, sugere que a proteína codificada por este gene é necessária para garantir a dormência de dos meristemas axilares que estão sendo formados nas axilas dos primórdios foliares em desenvolvimento.
- Alterações no acúmulo de miRNAs durante o desenvolvimento de gemas axilares não é devido a alterações na expressão da enzima DCL1.

REFERENCIAS

- ACHARD, P.; HERR, A.; BAULCOMBE, D.; HARBERD, N. Ethylene regulates Arabidopsis development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. **The Plant Cell Online**, Rockville, v. 15, n. 12, p. 2816, 2003.
- AGUILAR-MARTINEZ, J.; POZA-CARRION, C.; CUBAS, P. Arabidopsis BRANCHED1 acts as an integrator of branching signals within axillary buds. **The Plant Cell Online**, Rockville, v. 19, n. 2, p. 458, 2007.
- AITKEN, K.; HERMANN, S.; KARNO, K.; BONNETT, GD.; MCINTYRE, LC.; JACKSON. Genetic control of yield related stalk traits in sugarcane. **Theoretical and Applied Genetics**, Austin, v. 117, n. 7, p. 1191-1203, 2008.
- ALONSO-PERAL, M.; LI, J.; LI, Y.; ALLEN, R.; SCHNIPPENKOETTER, W.; OHMS, S.; WHITE, R.; MILLAR, A. The microRNA159-regulated GAMYB-like genes inhibit growth and promote programmed cell death in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Washington, v. 154, n. 2, p. 757, 2010.
- BANNO, H.; IKEDA, Y.; NIU, Q.; CHUA, N. Overexpression of *Arabidopsis* ESR1 induces initiation of shoot regeneration. **The Plant Cell Online**, Rockville, v. 13, n. 12, p. 2609, 2001.
- BARROSO, F. **O microRNA que veio do frio: regulação do miR319 durante estresse por frio em cana-de-açúcar**. 2010. 82 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

BENKOVA, E.; MICHNIEWICZ, M.; SAUER, M.; TEICHMANN, T.; SEIFERTOVA, D.; JARGENS, G.; FRIML, J. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. **Cell**, Cambridge, v. 115, n. 5, p. 591-602, 2003.

BENNETZEN, J. Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. **Plant Molecular Biology**, Dordrech, v. 42, n. 1, p. 251-269, 2000.

BLILOU, I.; XU, J.; WILDWATER, M.; WILLEMSSEN, V.; PAPONOV, I.; FRIML, J.; HEIDSTRA, R.; AIDA, M.; PALME, K.; SCHERES, B. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. **Nature**, London, v. 433, p. 39-44, 2005.

CARRARO, N.; FORESTAN, C.; CANOVA, S.; TRAAS, J.; VAROTTO, S. ZmPIN1a and ZmPIN1b encode two novel putative candidates for polar auxin transport and plant architecture determination of maize. **Plant Physiology**, Washington, v. 142, p. 254-264, 2006.

CHEN, X.; ZHANG, Z.; LIU, D.; ZHANG, K.; LI, A.; MAO, L. Promoter binding protein like transcription factors: star players for plant growth and development. **Journal of Integrative Plant Biology**, Oxford, v. 52, n. 11, p. 946-951, 2010.

CHEN, X.M. Small RNAs and their roles in plant development. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 25, p. 21-44, 2009.

CHUCK, G.; CIGAN, A.; SAETEURN, K.; HAKE, S. The heterochronic maize mutant Corngrass1 results from overexpression of a tandem microRNA. **Nature Genetics**, New York, v. 39, n. 4, p. 544-549, 2007.

CHUCK, G.; WHIPPLE, C.; JACKSON, D.; HAKE, S. The maize SBP-box transcription factor encoded by tasselsheath4 regulates bract development and the establishment of meristem boundaries. **Development**, Cambridge, v. 137, n. 8, p. 1243, 2010.

COOPERATIVA DE PRODUTORES DE CANA DE AÇÚCAR, AÇUCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Cana de açúcar**. Disponível em: <<http://www.copersucar.com.br>>. Acessado em: 07 nov. 2010.

CUBAS, P.; LAUTER, N.; DOEBLEY, J.; COEN, E. The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development. **Plant Journal**, Oxford, v. 18, n. 2, p. 215-222, 1999.

DHARMASIRI, N.; DHARMASIRI, S.; WEIJERS, D.; KARUNARATHNA, N.; JURGENS, G.; ESTELLE, M. AXL and AXR1 have redundant functions in RUB conjugation and growth and development in Arabidopsis. **Plant Journal**, Oxford, v. 52, n. 1, p. 114-123, 2007.

DOUST, A.N.; DEVOS, K.M.; GADBERRY, M.D.; GALE, M.D.; KELLOGG, E.A. Genetic control of branching in foxtail millet. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 24, p. 9045-9050, 2004.

FU, X.; HARBERD, N. Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. **Nature**, London, v. 421, n. 6924, p. 740-743, 2003.

GALWEILER, L.; GUAN, C.; MALLER, A.; WISMAN, E.; MENDGEN, K.; YEPHREMOV, A.; PALME, K. Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue. **Science**, Washington, v. 282, n. 5397, p. 2226, 1998.

GUBLER, F.; CHANDLER, P.; WHITE, R.; LLEWELLYN, D.; JACOBSEN, J. Gibberellin signaling in barley aleurone cells. Control of SLN1 and GAMYB expression. **Plant Physiology**, Washington, v. 129, n. 1, p. 191, 2002.

GUBLER, F.; KALLA, R.; ROBERTS, J.; JACOBSEN, J. Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pl alpha-amylase gene promoter. **Plant Cell**, Rockville, v. 7 p. 1879-1891, 1995.

GUBLER, F.; RAVENTOS, D.; KEYS, M.; WATTS, R.; MUNDY, J.; JACOBSEN, J. Target genes and regulatory domains of the GAMYB transcriptional activator in cereal aleurone. **The Plant Journal**, Oxford, v. 17, n. 1, p. 1-9, 1999.

HEISLER, M.; OHNO, C.; DAS, P.; SIEBER, P.; REDDY, G.; LONG, J.; MEYEROWITZ, E. Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the Arabidopsis inflorescence meristem. **Current Biology**, London, v. 15, n. 21, p. 1899-1911, 2005.

HUBBARD, L.; MCSTEEN, P.; DOEBLEY, J.; HAKE, S. Expression patterns and mutant phenotype of teosinte branched1 correlate with growth suppression in maize and teosinte. **Genetics**, Austin, v. 162, n. 4, p. 1927, 2002.

JIAO, Y.; WANG, Y.; XUE, D.; WANG, J.; YAN, M.; LIU, G.; DONG, G.; ZENG, D.; LU, Z.; ZHU, X. Regulation of OsSPL14 by OsmiR156 defines ideal plant architecture in rice. **Nature Genetics**, New York, v. 42, p. 541-544, 2010.

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

KARNO, J. **Physiology of bud outgrowth in sugarcane**. 2007. 131 p. Thesis (Doctor of Philosophy) - University of Queensland, Brisbane, 2007.

KEBROM, T.; BRUTNELL, T.; FINLAYSON, S. Suppression of sorghum axillary bud outgrowth by shade, phyB and defoliation signalling pathways. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 48-58, 2010.

KEBROM, T.; BURSON, B.; FINLAYSON, S. Phytochrome B represses Teosinte Branched1 expression and induces sorghum axillary bud outgrowth in response to light signals. **Plant Physiology**, Washington, v. 140, n. 3, p. 1109, 2006.

KLEIN, J.; SAEDLER, H.; HUIJSER, P. A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the *Antirrhinum majus* floral meristem identity gene SQUAMOSA. **Molecular & General Genetics**, New York, v. 250, n. 1, p. 7-16, 1996.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R.J.; AITKEN, K.S.; GROF, C.L.P.; BONNETT, G.D.; SMITH, G.R. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Culumbia, v. 41, n. 4, p. 345-363, 2005.

LEYSER, O. Dynamic integration of auxin transport and signalling. **Current Biology**, London, v. 16, n. 11, p. R424-R433, 2006.

_____. The control of shoot branching: an example of plant information processing. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 32, n. 6, p. 694-703, June 2009.

LI, Y.; SOLOMON, S. Ethephon: a versatile growth regulator for sugar cane industry. **Sugar Tech**, Cidade, v. 5, n. 4, p. 213-223, 2003.

LINCOLN, C.; BRITTON, J.; ESTELLE, M. Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*. **The Plant Cell Online**, Rockville, v. 2, n. 11, p. 1071, 1990.

LIU, Q.; ZHANG, Y.; WANG, C.; LUO, Y.; HUANG, Q.; CHEN, S.; ZHOU, H.; QU, L.; CHEN, Y. Expression analysis of phytohormone-regulated microRNAs in rice, implying their regulation roles in plant hormone signaling. **Febs Letters**, Amsterdam, v. 4, p. 723-728, 2009.

LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, New York, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LJUNG, K.; BHALERAO, R.; SANDBERG, G. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. **The Plant Journal**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 465-474, 2001.

LLAVE, C.; KASSCHAU, K.; RECTOR, M.; CARRINGTON, J. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. **Science**, Washington, v. 297, n. 5589, p. 2053, 2002.

LU, C.; TEJ, S.; LUO, S.; HAUDENSCHILD, C.; MEYERS, B.; GREEN, P. Elucidation of the small RNA component of the transcriptome. **Science**, Washington, v. 309, n. 5740, p. 1567-1569, 2005.

LUKENS, L.; DOEBLEY, J. Molecular evolution of the teosinte branched gene among maize and related grasses. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 18, p. 627-638, 2001.

MARGIS R.; FUSARO, A.F.; SMITH, N.A.; CURTIN, S.J.; WATSON, J.M.; FINNEGAN, E.J.; WATERHOUSE, P.M. The evolution and diversification of Dicers in plants. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 580, p. 2442–2450, 2006.

MATZKE, M.; KANNO, T.; HUETTEL, B.; DAXINGER, L.; MATZKE, A. Targets of RNA-directed DNA methylation. **Current Opinion in Plant Biology**, New York, v. 10, n. 5, p. 512-519, 2007.

MUKHERJEE, K.; BROCCHERI, L.; BARGLIN, T. A comprehensive classification and evolutionary analysis of plant homeobox genes. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 26, n. 12, p. 2775, 2009.

NAMBARA, E.; MARION-POLL, A. Absciscic acid biosynthesis and catabolism. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 56, n. 1, p. 165, 2005.

NOGUEIRA, F.T.S.; CHITWOOD, D.H.; MADI, S.; OHTSU, K.; SCHNABLE, P.S.; SCANLON, M.J.; TIMMERMAN, M.C.P. Regulation of small RNA accumulation in the maize shoot apex. **Plos Genetics**, New York, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2009.

O'BRIEN, T.; FEDER, N.; MCCULLY, M. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, New York, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.

OIKAWA, T.; KYOZUKA, J. Two-step rgulation of LAX PANICLE1 protein accumulation in axillary meristem formation in rice. **Plant Cell**, Rockville, v. 21, p. 1095-1108, 2009.

ONGARO, V.; BAINBRIDGE, K.; WILLIAMSON, L.; LEYSER, O. Interactions between axillary branches of Arabidopsis. **Molecular Plant**, Saint Paul, v. 1, n. 2, p. 388-400, 2008.

PALATNIK, J.; ALLEN, E.; WU, X.; SCHOMMER, C.; SCHWAB, R.; CARRINGTON, J.; WEIGEL, D. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. **Nature**, London, v. 425, n. 6955, p. 257-263, 2003.

PAPONOV, I.; TEALE, W.; TREBAR, M.; BLILOU, I.; PALME, K. The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. **Trends in Plant Science**, London, v. 10, n. 4, p. 170-177, 2005.

PARK, W.; LI, J.; SONG, R.; MESSING, J.; CHEN, X. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. **Current Biology**, London, v. 12, n. 17, p. 1484-1495, 2002.

PISKUREWICZ, U.; JIKUMARU, Y.; KINOSHITA, N.; NAMBARA, E.; KAMIYA, Y.; LOPEZ-MOLINA, L. The gibberellic acid signaling repressor RGL2 inhibits *Arabidopsis* seed germination by stimulating abscisic acid synthesis and ABI5 activity. **The Plant Cell Online**, Rockville, v. 20, n. 10, p. 2729, 2008.

RAJAGOPALAN, R.; VAUCHERET, H.; TREJO, J.; BARTEL, D. A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 20, n. 24, p. 3407, 2006.

REINHARDT, D.; KUHLEMEIER, C. Plant architecture. **Embo Reports**, Oxford, v. 3, n. 9, p. 846-851, 2002.

REINHARDT, D.; MANDEL, T.; KUHLEMEIER, C. Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. **The Plant Cell Online**, Rockville, v. 12, n. 4, p. 507, 2000.

REINHART, B.J.; WEINSTEIN, E.G.; RHOADES, M.W.; BARTEL, B.; BARTEL, D.P. MicroRNAs in plants. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 16, n. 17, p. 2313-2313, 2002.

REYES, J.; CHUA, N. ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination. **The Plant Journal**, Oxford, v. 49, n. 4, p. 592-606, 2007.

SCHNEIDER, H. **Métodos de análise filogenética**: um guia prático. Ribeirão Preto: Holos Editora; Sociedade Brasileira de Genética, 2003. 114 p.

SCHWAB, R.; PALATNIK, J.; RIESTER, M.; SCHOMMER, C.; SCHMID, M.; WEIGEL, D. Specific effects of MicroRNAs on the plant transcriptome. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 8 n. 4, p. 517-527, 2005.

SCHWARZ, S.; GRANDE, A.; BUJDOSO, N.; SAEDLER, H.; HUIJSER, P. The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 control shoot maturation in *Arabidopsis*. **Plant Molecular Biology**, Dordrech, v. 67, n. 1, p. 183-195, 2008.

SENTOKU, N.; SATO, Y.; KURATA, N.; ITO, Y.; KITANO, H.; MATSUOKA, M. Regional expression of the rice KN1-type homeobox gene family during embryo, shoot, and flower development. **The Plant Cell Online**, Rockville, v. 11, n. 9, p. 1651, 1999.

SHIMIZU-SATO, S.; MORI, H. Control of outgrowth and dormancy in axillary buds. **Plant Physiology**, Washington, v. 127, n. 4, p. 1405, 2001.

SUNKAR, R.; ZHU, J. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. **Science's STKE**, Washington, v. 16, n. 8, p. 2001, 2004.

SUNKAR, R.; GIRKE, T.; JAIN, P.; ZHU, J. Cloning and characterization of microRNAs from rice. **The Plant Cell Online**, Rockville, v. 17, n. 5, p. 1397, 2005.

TEIXEIRA, F.; HEREDIA, F.; SARAZIN, A.; ROUDIER, F.; BOCCARA, M.; CIAUDO, C.; CRUAUD, C.; POULAIN, J.; BERDASCO, M.; FRAGA, M. A role for RNAi in the selective correction of DNA methylation defects. **Science**, Washington, v. 323, n. 5921, p. 1600, 2009.

TRUJILLO, L.; SOTOLONGO, M.; MENENDEZ, C.; OCHOGAVIA, M.; COLL, Y.; HERNANDEZ, I.; BORRAS-HIDALGO, O.; THOMMA, B.; VERA, P.; HERNANDEZ, L. / SodERF3, a novel sugarcane ethylene responsive factor (ERF), enhances salt and drought tolerance when overexpressed in tobacco plants. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 49, n. 4, p. 512, 2008.

TSUJI, H.; AYA, K.; UEGUCHI TANAKA, M.; SHIMADA, Y.; NAKAZONO, M.; WATANABE, R.; NISHIZAWA, N.; GOMI, K.; SHIMADA, A.; KITANO, H. GAMBYB controls different sets of genes and is differentially regulated by microRNA in aleurone cells and anthers. **The Plant Journal**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 427-444, 2006.

VAN DER FITS, L.; MEMELINK, J. ORCA3. a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. **Science's STKE**, Washington, v. 289, n. 5477, p. 295, 2000.

VARKONYI-GASIC, E.; WU, R.; WOOD, M.; WALTON, E.; HELLENS, R. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. **Plant Methods**, New York, v. 3, n. 12, p. 1-12 p. 2007, 2007.

VAZQUEZ, F. *Arabidopsis* endogenous small RNAs: highways and byways. **Trends in Plant Science**, London, v. 11, n. 9, p. 460-468, 2006.

VETTORE, A.; SILVA, F.; KEMPER, E.; ARRUDA, P. The libraries that made SUCEST. **Genetics and Molecular Biology**, Rineirao Preto, v. 24, p. 1-7, 2001.

VIETEN, A.; VANNESTE, S.; WI NIEWSKA, J.; BENKOVA, E.; BENJAMINS, R.; BEECKMAN, T.; LUSCHNIG, C.; FRIML, J. Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. **Development**, Cambridge, v. 132, n. 20, p. 4521, 2005.

VOINNET, O. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. **Cell**, Cambridge, v. 113, n. 4, p. 669-687, 2009.

VOLLBRECHT, E.; REISER, L.; HAKE, S. Shoot meristem size is dependent on inbred background and presence of the maize homeobox gene, knotted1. **Development**, Cambridge, v. 127, n. 14, p. 3161-3172, 2000.

VOLLBRECHT, E.; VEIT, B.; SINHA, N.; HAKE, S. The developmental gene knotted-1 is a member of a maize homeobox gene family. **Nature**, London, v. 350, p. 241-243, 1991.

WANG, J.; HU, H.; WANG, G.; LI, J.; CHEN, J.; WU, P. Expression of PIN genes in rice (*Oryza sativa* L.): Tissue specificity and regulation by hormones. **Molecular Plant**, New York, v. 2, n. 4, p. 823, 2009.

WANG, Y.H.; LI, J.Y. Molecular basis of plant architecture. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 253-279, 2008.

WOODGER, F.; MILLAR, A.; MURRAY, F.; JACOBSEN, J.; GUBLER, F. The role of GAMYB transcription factors in GA-regulated gene expression. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 22, n. 2, p. 176-184, 2003.

XIE, K.; WU, C.; XIONG, L. Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice. **Plant Physiology**, Washington, v. 142, n. 1, p. 280, 2006.

XIE, Z.; KASSCHAU, K.; CARRINGTON, J. Negative feedback regulation of dicer-like1 in *Arabidopsis* by microRNA-guided mRNA degradation. **Current Biology**, London, v. 13, n. 9, p. 784-789, 2003.

XU, M.; ZHU, L.; SHOU, H.; WU, P. A PIN1 family gene, OsPIN1, involved in auxin-dependent adventitious root emergence and tillering in rice. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 46, n. 10, p. 1674, 2005.

XUE, M.; ZHU, L.; SHOU, H.; WU, P. Characterization and expression profiles of miRNAs in rice seeds. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 37, p. 916-930, 2008.

ZANCA, A.; VICENTINI, R.; ORTIZ, F.; DEL BEM, L.; SILVA, M.; VINCENTZ, M.; NOGUEIRA, F. Identification and expression analysis of microRNAs and targets in the biofuel crop sugarcane. **BMC Plant Biology**, Michigan, v. 10, n. 1, p. 260-269, 2010.

ZHANG, B.; XIAO PING, P.; QING LIAN, W.; COBB, G.; ANDERSON, T. Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis. **Cell Research**, New York, v. 15, n. 5, p. 336-360, 2005.

ZHU, Q.; SPRIGGS, A.; MATTHEW, L.; FAN, L.; KENNEDY, G.; GUBLER, F.; HELLIWELL, C. A diverse set of microRNAs and microRNA-like small RNAs in developing rice grains. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 18, n. 9, p. 1456, 2008.

ANEXOS

Anexo A - Artigo científico intitulado "Identification and expression analysis of microRNAs and targets in the biofuel crop sugarcane".

Identification and expression analysis of microRNAs and targets in the biofuel crop sugarcane

Almir S Zanca^{1*}; Renato Vicentini^{1*}; Fausto A Ortiz-Morea²; Luiz EV Del Bem¹; Marcio J da Silva¹; Michel Vincentz^{1,3}; Fabio TS Nogueira^{2,4¶}.

¹Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genetica (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil.

²Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", (ESALQ)/USP, Piracicaba, SP, Brazil.

³Depto de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

⁴Depto de Genetica, Instituto de Biociencias, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brazil.

*These authors contributed equally to this work

¶To whom correspondence should be addressed:

Fabio T.S. Nogueira

Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Distrito de Rubião Jr., s/nº

18618-970 Botucatu, Sao Paulo, Brazil

Phone: (+55-14) 3811-6229/6016 r.33

E-mail: ftsnogue@ibb.unesp.br

ABSTRACT

BACKGROUND: MicroRNAs (miRNAs) are small regulatory RNAs, some of which are conserved in diverse plant genomes. Therefore, computational identification and further experimental validation of miRNAs from non-model organisms is both feasible and instrumental for addressing miRNA-based gene regulation and evolution. Sugarcane (*Saccharum spp.*) is an important biofuel crop with publicly available expressed sequence tag and genomic survey sequence databases, but little is known about miRNAs and their targets in this highly polyploid species.

RESULTS: In this study, we have computationally identified 19 distinct sugarcane miRNA precursors, of which several are highly similar with their sorghum homologs at both nucleotide and secondary structure levels. The accumulation pattern of mature miRNAs varies in organs/tissues from the commercial sugarcane hybrid as well as in its corresponding founder species *S. officinarum* and *S. spontaneum*. Using sugarcane *MIR827* as a query, we found a novel *MIR827* precursor in the sorghum genome. Based on our computational tool, a total of 46 potential targets were identified for the 19 sugarcane miRNAs. Several targets for highly conserved miRNAs are transcription factors that play important roles in plant development. Conversely, target genes of lineage-specific miRNAs seem to play roles in diverse physiological processes, such as *SsCBP1*. *SsCBP1* was experimentally confirmed to be a target for the monocot-specific miR528. Our findings support the notion that the regulation of *SsCBP1* by miR528 is shared at least within graminaceous monocots, and this miRNA-based post-transcriptional regulation evolved exclusively within the monocots lineage after the divergence from eudicots.

CONCLUSIONS: Using publicly available nucleotide databases, 19 sugarcane miRNA precursors and one new sorghum miRNA precursor were identified and classified into 14 families. Comparative analyses between sugarcane and sorghum suggest that these two species retain homologous miRNAs and targets in their genomes. Such conservation may help to clarify specific aspects of miRNA regulation and

evolution in the polyploid sugarcane. Finally, our dataset provides a framework for future studies on sugarcane RNAi-dependent regulatory mechanisms.

BACKGROUND

MicroRNAs (miRNAs) are small regulatory RNAs (19-21 nt) that play crucial roles in diverse aspects of plant development [1-3], biotic and abiotic stress responses [4, 5], signal transduction and protein degradation [6, 7]. MiRNAs are generated by stepwise processing of RNA polymerase II (Pol II)-dependent primary miRNA transcripts (pri-miRNAs). The pri-miRNAs typically form an imperfect fold-back structure, which is processed into a stem-loop precursor (pre-miRNA) and further excised as an RNA duplex by the DICER-LIKE1 (DCL1) enzyme. Partial or complete base-pairing between the miRNA and its target RNA allows the miRNA-associated RNA-induced silencing complexes (RISCs) to promote translational inhibition, accelerated exonucleolytic mRNA decay, and/or mRNA cleavage through slicing within miRNA-mRNA base-pairing (for review, see [8]). The majority of the target genes of highly conserved miRNAs are transcription factors that play important roles in development [9]. Conversely, lineage-specific miRNAs seem to regulate the expression of a broader type of genes, including those involved in cellular metabolism, stress response, and post-translational modifications [7, 10].

The identification of miRNAs and their targets in a large number of plant species is an important step to understand the function and evolution of miRNAs and miRNA-dependent gene regulation. Over 1,300 miRNAs from eudicotyledonous and 832 miRNAs from monocotyledonous plants have been deposited in the latest release of miRBase (release 14.0 September 2009). Although deep sequencing methods have substantially contributed to the identification of conserved and lineage-specific miRNAs in model species [11], these approaches are time-consuming and relatively expensive. In this regard, public EST databases

and genomic survey sequences (GSSs) have become attractive alternatives to identify non-coding sequences through computational approaches in non-model plants.

The fact that most known miRNAs are evolutionarily conserved raises the possibility of identifying new miRNA homologs in other species using computer-based strategies [12], and such *in silico* approaches have been reviewed and classified not only as homology-based but also as structure similarity-based searches [7, 13]. Therefore, recent computational methods provide an accurate, fast, inexpensive, and consequently convenient way to retrieve miRNA precursor sequences from publicly available sequence databases. Finally, target mRNAs of conserved miRNAs can be searched using web-based [7] or in-house algorithms and analyzed across plant species.

Most identified miRNAs and their targets have been predicted in plants for which whole genome information is available such as *Arabidopsis thaliana* and rice. Currently, there is no experimental and only scarce computational information about miRNAs and their targets in sugarcane (*Saccharum spp.*). Sugarcane is an economically important biofuel crop. Recently, it has become a target for improvement of sustainable biomaterial production due to its high biomass productivity and built-in containment features [14]. Modern sugarcane cultivars are highly polyploid, aneuploid hybrids between *S. officinarum* L. (octoploid, with $2n = 80$ chromosomes) and *S. spontaneum* L. (ploidy level of 5–16, with $2n = 40$ –128 chromosomes). Modern sugarcane cultivars typically have $2n = 100$ –130 chromosomes, of which approximately 15–20% are derived from *S. spontaneum* and 5% are recombinants derived from both species. Therefore, the genome of modern sugarcane cultivars has at least 10 copies of most homo(eo)logous loci, contributing to the high complexity of its genome [15].

In this study, we used conserved miRNAs to systematically search public EST and GSS databases for sugarcane pri-miRNAs or miRNA precursors. A total of 19 distinct sugarcane pri-miRNAs were identified by our computational protocol, of which nine are monocot-specific. The expression profiles of selected sugarcane miRNAs were monitored by pulsed stem-loop RT-PCR [16] in organs/tissues of a modern cultivar as well as in *S. officinarum* and *S. spontaneum*. To identify target genes of the identified miRNAs, we developed a BLAST-based computational tool to search the NCBI EST and BAC sequences of sugarcane, rice, and sorghum. By using this method, we predicted several target messages, of which one novel target was experimentally tested and confirmed. Finally, we integrated sugarcane miRNA primary precursor and target information into a web-based database (<http://http://sysbiol.cbmeg.unicamp.br/SCmiRNA>), which is publicly available. The identification of miRNAs and their targets is important not only to help us learn more about the roles of miRNAs in sugarcane development and physiology, but also to provide a framework for further studies on RNAi-based regulation mechanisms in this highly polyploid species.

RESULTS AND DISCUSSION

Identification of miRNA primary transcripts in *Saccharum spp.*

MiRNAs have been intensively studied in a wide range of plants over the past few years [8], but no systematic and comprehensive study has been performed on sugarcane, one of the most promising biofuel crops worldwide [17]. In order to computationally identify miRNAs in sugarcane, we developed a homology-based strategy based on [7, 13] that included the following steps: First, we searched the sugarcane EST and GSS databases to find sequences matching previously known plant miRNAs. Then we predicted the secondary structures of the potential precursor sequences using MFOLD. The third step

consisted of an in-house MIRcheck-based script to verify the putative pri-miRNA candidates (parameters described in Methods), followed by a manual inspection to eliminate possible false positives. Finally, closely related EST sequences were blasted against each other to detect redundancy and then further analyzed. We considered as one miRNA precursor those ESTs sharing > 95% identity at the sequence level. This protocol allowed us to retrieve 19 distinct miRNA precursors that were classified into 14 families (Table 1). Amongst them, 18 miRNA precursors were found in the EST database and a single one was found in the GSS sequences, indicating the latter is still a poor source of *in silico* miRNA discovery in sugarcane. Although previous reports have identified some sugarcane miRNA precursors [12, 13], in this study we have advanced these findings by systematically analyzing these precursors as well as identifying new ones. For instance, we identified precursors for sugarcane miR827, miR528, miR1128, and miR1432 (Table 1). Moreover, we evaluated the expression patterns of selected miRNAs in different sugarcane tissues/organs (see next section).

The sugarcane miRNA families identified in this study include the six families already deposited in the miRbase (Table 1), indicating the robustness of our approach. Nonetheless, careful inspection of the sugarcane miRNA precursor sequences deposited in the miRbase v.14 and comparison with our analysis revealed some divergences between these databases. For example, the *SsMIR156b/c* (Table 1) was previously annotated as a single stem-loop *MIR156* precursor (miRbase v.14). However, our analyses revealed that this precursor belongs to a cluster representing a two-tandem microRNA precursor, which is highly similar to its sorghum homolog (90% nt identity) and to the maize *Corngrass1* microRNA (84% nt identity) [18]. Moreover, genomic DNA PCR amplification from sugarcane hybrid RB 83-5486 using specific primers and subsequent sequencing indicate that *SsMIR156b/c* locus encodes tandem *MIR156* genes (data not shown). Comparison among the miRbase-derived precursor sequences and with those identified in this study suggests that the 16 previously annotated sugarcane miRNA precursors represent

only eight different precursors (Table 1). For instance, we identified only two distinct precursors of miR408, *SsMIR408a* and *SsMIR408b* (Table 1), instead of five (miRbase v.14). Closer inspection suggests that *SsMIR408a* and *SsMIR408b* are likely different alleles of the same locus. This observation is supported by the fact that *MIR408* genes have been found only as one copy in all plant genomes evaluated to date (miRbase v.14). The discrepancies between our data and previous annotation in the miRbase may be due to the use of SoGI Release 2.2 (July, 2008) that contains substantially more Tentative Consensus (TCs) than the earlier releases, which likely reflect differences in EST clustering or assembling.

In agreement with previous results [7, 10], most sugarcane miRNA sequences have uracil as their first nucleotide (13 out of 19 mature sugarcane miRNAs; Table 1). Moreover, sugarcane miRNA precursors displayed high minimal free energy index (MFEI) values (average 1.02 ± 0.22), which is a criterion used for distinguishing miRNA precursors from other types of RNAs. MFEI is a parameter that considers not only the minimal free energy (MFE) value of a particular sequence but also its length and G+C content. MFEI values were calculated as described by [19].

MiRNAs are located either in the 5'-arm or 3'-arm of the stem-loop hairpin pre-miRNA sequences (Table 1). All new identified miRNA precursors could fold into stem-loop structures (see additional file 1), following the rules and parameters reported by [7]. One exception was the EST TC87836, which displays high similarity (e-value 0.0 and 89.5% nt identity) with one of the *MIR319* precursors present in the draft of the *Sorghum bicolor* genome [20] (see additional file 2). It could not form a suitable stem-loop structure and thus it was not validated by our in-house MIRcheck-based script. This might be due to the fact that the miR319* is located at the 5' end of the sequence, which is not present in the TC87836 sugarcane EST. Nevertheless, based on its extensive homology with sorghum *MIR319* precursor (see additional file 2), we annotated this TC as a potential *SsMIR319* precursor (Table 1). That most ESTs do

not contain their entire 5'-end sequence information undermines EST databases as sources for miRNA precursor searching. Based on the example given in this study, it may be interesting to develop rules and parameters to assign EST sequences as miRNA precursors based only upon extensive nucleotide identity with precursors from highly closely related species.

Not only *SsMIR319*, but several sugarcane pre-miRNAs show high sequence similarity with their sorghum homologs (values between 86% and 94% nt identity). Sorghum and sugarcane are each other's closest relatives among cultivated crops. They belong to the *Andropogoneae* tribe and diverged from a common ancestor around 8–9 Myr ago [15]. Based on genomic sequence comparisons [15, 20], it is likely that sugarcane and sorghum did not have sufficient time to diverge, which reflects the high degree of identity observed between their miRNA precursors.

This feature allowed us, by using sugarcane *MIR827* pre-miRNA sequence, to identify the sorghum *MIR827* precursor (Fig. 1), which was not annotated in previous work [20]. Sorghum *MIR827* precursor is located at chromosome 4 (position 50273627 to 50273779). The mature miR827 is highly conserved among grasses and displays few mismatches with sequences from *Arabidopsis* and *Populus* (Fig. 1A; [21]). The new sorghum miRNA precursor was validated by our in-house MIRcheck-based script and it showed high similarity with its sugarcane homolog not only at the sequence level, but also at a secondary structure level (Fig. 1B).

Among the monocot-specific miRNA precursors, we have identified three potential precursors of microRNA444 (Table 1). Interestingly, *SsMIR444b* and *SsMIR444c* contain tandem and overlapping mature miRNA sequences (additional file 1), similar to *MIR444* precursors identified in rice and sorghum [20, 22].

At least in rice, such precursors are able to generate natural antisense miRNAs, or nat-miRNAs. The production of nat-miRNAs depends upon sense/antisense transcription and alternative splicing of the precursors prior to DCL1 cleavage [22]. These nat-miRNAs seem to be restricted to monocot gramineae, indicating this new pathway is less than 50 million years old.

Recent works suggest that some plant and human miRNA families are derived from a subset of DNA-type transposable elements (TEs) called miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs; [23, 24]). MITEs evolved from corresponding ancestral full-length (autonomous) elements that originally encoded short interfering RNAs (siRNAs). Piriyaopongsa and Jordan [24] found several examples in rice and *Arabidopsis* supporting the notion that evolutionary intermediates may exist as TEs that encode both siRNAs and miRNAs. Moreover, Voinnet [8] suggests an association of recently evolved miRNA families with MITEs. Thus, we compared the identified sugarcane pri-miRNA sequences against the Gramineae Repeat database (<http://plantrepeats.plantbiology.msu.edu/gramineae.html>) using BLASTN (e-value $< e^{-10}$) to identify possible MITE-derived hairpin precursors. Only miR1128 and all three miR437 precursors presented substantial similarity with known MITEs (Table 1). Accordingly, their maize homologs also have similarity with MITE-derived hairpin sequences [25]. It has been shown in *Arabidopsis* that miRNA genes evolved via local inverted duplication events, which generated sequences capable of folding back into hairpin structures when expressed [26]. Similarly, over the course of evolution, MITEs might have stimulated the RNAi biogenesis enzymes to process hairpin-like structures to generate miRNAs with endogenous gene regulatory functions [24]. We were able to detect mature miR1128 by RT-PCR - as shown in the next section - and sequencing of the generated amplicon confirmed its identity (data not shown). Moreover, multiple sequence alignment of pre-miR1128 from sugarcane, switchgrass (*Panicum virgatum*) and wheat (*Triticum aestivum*) [27, 28] suggests partial conservation of the miR1128 and miR1128* among these species, but not the surrounding precursor sequences (Fig. 2). Along with other

requirements [7, 8], the conservation of the miRNA and miRNA* sequences in the precursor is a critical parameter to define a miRNA-generating locus. Taken together, our data support the miRNA status of the sugarcane miR1128. However, we cannot rule out the possibility that MITE-associated miRNAs may lose their miRNA status in the future [25].

Given the limited number of sugarcane EST and GSS sequences available as well as existent sequencing errors, the frequency of candidate miRNA precursors identified in this study is comparable to others using such databases [29, 30]. It is noteworthy that all miRNAs reported in this study have been identified using previously known miRNAs from several plant species. Therefore, we did not uncover miRNAs that are specific to sugarcane. Further investigations that employ small RNA libraries combined with computational approaches are needed to identify sugarcane-specific miRNAs.

Expression patterns of sugarcane miRNAs

The expression pattern of a miRNA in organs/tissues might provide initial clues regarding its biological function. Therefore, we evaluated the expression of selected miRNAs identified in this work (Table 1). We have chosen one miRNA poorly conserved (miR408), one highly conserved among plant species (miR156), and four potential monocot-specific miRNAs (miR444, miR528, miR1128, and miR1432). In this study, stem-loop RT-PCR approach was applied to detect mature miRNA species in distinct organs/tissues from the commercial sugarcane hybrid RB 83-5486. The miRNAs were detected in all organs/tissues analyzed, although with distinct expression profiles (Fig. 3A). Transcripts of miR408 accumulate at high levels in all organs/tissues but lateral buds, while miR156 accumulates at higher levels only in leaf blade tissues. Sugarcane miR444 and miR1128 seem to be similarly expressed in the organs/tissues evaluated (Fig. 3A). miR1432 mature transcripts accumulate at higher levels in leaf sheath

and lateral buds, whereas miR528 transcripts were detected at lower levels in lateral buds. It is noteworthy that all tested SsmiRNAs, though at variable levels, are expressed in lateral buds (Fig. 3A). Sugarcane is typically propagated via rhizomes, which contain one or more lateral buds. The new plantlet will arise from these buds and further develop into mature plants (<http://sugarcanecrops.com>). Therefore, efficient bud outgrowth is an extremely important step for the initial development of sugarcane. It is possible that some of these miRNAs play important roles in the genetic regulation of sugarcane lateral bud outgrowth. Functional studies may provide clues on the possible roles of these miRNAs in the early development of sugarcane.

We also compared the expression profiles of these miRNAs between *S. officinarum* and *S. spontaneum* to evaluate whether both species produce detectable mature miRNA molecules. All miRNAs are detected in the evaluated organs/tissues from these two closely related species (Fig. 3B). Although most miRNAs seem to accumulate similarly in both species, some presented variations in abundance when comparing the same organs/tissues at similar developmental stages of *S. officinarum* and *S. spontaneum*. For example, miR444 is slightly more abundant in vegetative apex of *S. officinarum*. In contrast, miR408 accumulates at higher levels in leaf blade tissues of *S. spontaneum* (Fig. 3B). Similar data was observed for miRNAs accumulating in some organs/tissues of stable *Arabidopsis* allopolyploids [31]. The relatively low variation in miRNA accumulation between these species is likely a reflection of their level of ploidy. Highly polyploid species might have developed a genetic buffering against extensive miRNA expression variation in particular organs/tissues or developmental stages to maintain target gene expression stability across generations of ploidy [31]. Our data also present the possibility that both ancient species contributed similarly to the miRNA-based regulatory pathways present in modern sugarcane hybrids. It will be interesting to test whether all target loci in hybrid modern cultivars are down-regulated by

miRNAs from one ancient progenitor or from both.

The final spatiotemporal accumulation of mature small RNAs relies, at least in part, upon the transcriptional control of *MICRORNA (MIR)* genes [32] and such regulation may be conserved among closely related species. To gain more insight into the transcriptional regulation of the sugarcane *MIR* genes, we analyzed *in silico* the *SsMIR1432* locus, which has available genomic sequences (Table 1). Firstly, we employed eShadow software [33] to search for evolutionary conserved regions in *MIR1432* locus from sugarcane, sorghum, and maize. We detected several potentially conserved regions, of which most are localized upstream of the predicted pre-miRNA and one highly conserved region includes the pre-miR1432 (Fig. 4). Secondly, we scanned for putative conserved transcription factor binding (TFB) sites as well as for tandem repeats and CpG/CpNpG islands using JASPAR (<http://jaspar.cgb.ki.se>) and PlantPAN [34] databases, respectively. CpG/CpNpG islands are regions of the genome typically associated with promoters and 5' ends of several genes. Hypo or hypermethylation of CpG/CpNpG islands in plants are of considerable interest because they relate to patterns of gene regulation, epigenetic phenomena, and chromosome structure [35].

Although we did not detect any tandem repeats, the CpG/CpNpG islands found in the three *MIR1432* loci overlap broadly with the possibly conserved regions upstream of pre-miR1432. These regions also included common predicted TFB sites for the investigated species, such as an auxin response element (AuxRE) (Fig. 4). Taken together, these findings suggest the promoter regions of the sugarcane *MIR1432* locus share conserved elements with its sorghum and maize homologs. Such elements might be biologically important for the final organ/tissue localization of miR1432 mature species and, consequently, for target down-regulation. It has recently been reported an evolutionary sequencing

comparison for the *MIR319a* locus in *Arabidopsis* and related *Brassicaceae*. Reporter experiments have demonstrated that regions under stronger evolutionary constraints contain important information for *MIR319a* transcription [36]. As more sugarcane genomic sequences become available, it will be interesting to verify whether most, if not all homologous miRNAs between sorghum and sugarcane also share conserved elements in their promoters.

Potential targets of sugarcane miRNAs

Previous studies demonstrated that miRNAs regulate gene expression mainly by binding to perfect or near-perfect complementary sites of mRNA sequences [37-39]. Such behavior indicates that plant miRNA targets can be predicted by simple sequence homology-based searches. Using an in-house BLASTn-based algorithm (described in Methods), we identified a total of 46 potential distinct target sequences for the 14 identified sugarcane miRNA families. Consistent with the essential roles of miRNAs in regulating a variety of biological processes in plants [8], sugarcane target genes seem to be associated not only with development but also with diverse physiological processes (Table 2). Because NCBI sugarcane EST database is limited and its corresponding proteins have not yet been fully annotated, we have additionally applied the same search for rice and sorghum protein-coding sequences. Most sugarcane miRNA targets identified here have homologs in rice and sorghum (Table 2). Although it is unlikely that true targets have been missed in our search, it is important to mention that BLAST-based search strategies have limitations to detect some targets even if a word size of seven is used. One such example of this are the miRNAs miR395b, miR395c, and miR395f targeting *APS1* (At3g22890) and *APS3* (At4g14680) genes within *Arabidopsis* [40]. The longest stretch of matching base pairs is six, which falls under the minimum word size employed by BLAST [40].

Interestingly, some target genes that are conserved across angiosperms seem to have lost their miRNA-based regulation in specific lineages [41]. One such example seems to be the new targets for the possible monocot-specific miR528 (Table 2). The three identified ESTs encode Cu²⁺-binding domain-containing proteins (referred to hereafter as SsCBPs; *Saccharum spp.* Cu²⁺-binding domain-containing proteins). To evaluate the relationship between this lineage-specific miRNA and its angiosperm-conserved targets, we initially investigated the accumulation of mature miR528 transcripts in distinct monocots and in the core eudicot *Arabidopsis*. As expected, miR528 transcripts were detected in all graminaceous monocots but not in *Arabidopsis* (Fig. 5A). Although targets for the miR528 have been recently predicted in maize [42], no experimental validation has been done to confirm such predictions. Thus, we used the RLM-RACE method to map the cleavage sites in one of the predicted *SsCBP*s (*SsCBP1*, TC90826). As expected, most 5'-ends of the *SsCBP1* mRNA fragments were mapped to the nucleotide that pairs to the tenth nucleotide of the microRNA, confirming its cleavage guided by miR528 (Fig. 5B).

To gain more insight into the evolutionary history of the CBPs, we performed a phylogenetic analysis using *SsCBP1* sequence as a query to search for homologous proteins within genomic and EST databanks of a set of green plants, including angiosperms, basal land plants, and green algae (Viridiplantae 1.0; see Methods). Our analysis revealed that *SsCBP1* belongs to a Possible Group of Orthologous (PoGO A; for a definition and criteria for PoGO, see [43]) that integrates only angiosperm sequences (Fig. 5C). The simplest explanation is that these genes share a common origin within the last common ancestor of angiosperms. Interestingly, the miR528-target recognition site is only present within monocot genes from PoGO A (data not shown). All eudicots orthologous to *SsCBP1* from *Arabidopsis*, poplar, grape, and soybean genomes completely lack the miR528-target recognition site, suggesting that miR528 is indeed a monocot-specific microRNA. Taken together, our findings support the notion that the regulation of

SsCBP1 by miR528 is shared at least within graminaceous monocots, and this miRNA-based post-transcriptional regulation evolved exclusively within the monocots lineage after the divergence from eudicots. Further studies on plant CBPs are needed to define their physiological role(s) and the possible evolutionary advantages given by the miR528-based post-transcriptional regulation of monocot *SsCBP1* orthologs.

CONCLUSIONS

Our findings indicate that several sugarcane miRNA precursors share high homology with their sorghum's possible orthologous beyond miRNA mature sequence. In the case of pre-miR1432, which was obtained from genomic sequences, we found precursor-surrounding regions conserved among sugarcane, sorghum, and maize homologs. This finding indicates these genes may share common genetic and epigenetic regulatory programs. However, further work that includes additional homologous sequences from other closely related species is required to confirm such conservation. Our data also indicate that sugarcane miRNAs are expressed in commercial hybrids as well as in the ancient progenitors *S. officinarum* and *S. spontaneum*. Our approach leads to the prediction of several conserved and non-conserved sugarcane miRNA targets in the available EST and genomic databases. The data is available in the public website ([http:// sysbiol.cbmeg.unicamp.br/SCmiRNA](http://sysbiol.cbmeg.unicamp.br/SCmiRNA)) that will be continuously updated to incorporate future miRBase updates. Our findings will be a useful resource toward tracing the evolution of small RNA-based regulation in sugarcane and related species. Most importantly, this study will serve as a foundation for future research into the functional roles of miRNAs and their target genes in this important biofuel crop.

METHODS

Plant material and RNA extraction

Leaf blade and sheath tissues were collected from three-week-old sugarcane seedlings (hybrid RB 83-5486) grown in greenhouse conditions. Mature six-month-old plants of the same hybrid were used to obtain lateral buds and leaf roll (apical meristem plus leaf primordia) tissues. We also collected tissues from *Saccharum officinarum* (accession Muntok, Java) and *S. spontaneum* (accession SES205A). Five-month-old plantlets cultivated *in vitro* were transferred to greenhouse conditions. After one month, leaf blade and vegetative apex tissues (pool of four plantlets) were harvested from both species. Tissues were also collected from whole three-week-old seedlings of sugarcane hybrid (RB83-5486) and *Sorghum bicolor* (BTx623), four-week-old seedlings of *Zea mays*, one-month-old plantlets of *Oryza sativa* (ssp. japonica cv Nipponbare), and from one-month-old plantlets of *Arabidopsis thaliana* (Columbia). Total RNA was extracted using Trizol reagent according to manufacturer's instructions.

Stem–loop reverse transcriptase (RT)-PCR

Stem–loop RT and PCR primers for sugarcane miR408, miR156, miR444, miR528, miR1128, and miR1432 were designed according to [16] (see Additional file 3). Total RNA was treated with DNase I (Promega) to eliminate any residue of genomic DNA. Six-hundred nanograms of DNase-treated RNA were used to generate the first strand cDNA [16]. Oligo(dT) primer was added to the reaction for further normalization with the endogenous control gene *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH; [44]). The reaction mixture was placed at GeneAmp9700 thermocycler (Applied Biosystems) and incubated at 16°C for 30 minutes, followed by 60 cycles of pulsed reverse transcription at 30°C for 30 seconds, 42°C for 30 seconds, and 50°C for one second.

cDNA dilutions were used for PCR reactions as following: 1.0 µL of cDNA, 1.5 mM Magnesium Sulfate, 0.25 mM each dNTP, 10 pmol each primer, and 1 U of Taq DNA Polymerase (Fermentas). The reactions were placed in the thermocycler with the following conditions: 94°C for two minutes and appropriate cycle numbers of 94°C for 20 seconds, 60°C for 30 seconds, and 72°C for 45 seconds. All reactions were repeated at least three times.

Genomic PCR

Prior use of *SsGAPDH* (accession TC77224) as a control to evaluate miRNA accumulation in sugarcane ancient wild species, the efficiency of its primers was tested in genomic DNA from leaves of *S. officinarum* (accession Muntok, Java) and *S. spontaneum* (accession SES205A; see additional file 4). Thirty nanograms of genomic DNA were used as a template for PCR reactions. The reactions were placed in the thermocycler with the following conditions: 94°C for three minutes and 32 cycles of 94°C for 20 seconds,

58°C for 30 seconds, and 72°C for 45 seconds. The reactions were repeated twice.

Analysis of 5' RACE

Five micrograms of total RNA from sugarcane plantlets (hybrid RB 83-5486) were ligated to a RNA adapter, in a reaction mixture containing 0.5 U/μL of T4 RNA Ligase, 4 U/μL RNase inhibitor, and 1 mM ATP. The subsequent steps were performed according to the manufacturer's guide of the GeneRacer kit (Invitrogen). The first PCR was done using the following *SsCBP1* specific primer: 5'-GAAAGCCCTCTCCGCCAGC. The PCR reaction was subsequently used as a template for a semi-NESTED PCR with an internal *SsCBP1* specific primer (5'-GCGCCGTCGCCGCACCC). After amplification, 5' RACE products were gel-purified and cloned, and at least 13 independent clones were randomly chosen and sequenced.

Sugarcane miRNA precursor identification

Sugarcane ESTs and GSSs were retrieved from The Gene Index Program (116,588 unique sequences; Release 2.2, July 2008) and NCBI, respectively. The sequences were used as drivers for a BLASTX search (e-value e^{-10}) against the NCBI protein sequence database (September 2008). All potential no hit sequences were recorded as a distinct dataset. Recorded miRNAs from plants were obtained from the miRBase (over 2,300 miRNA sequences; Release 14.0) [45] and used as drivers for BLASTN search of sugarcane miRNA precursors in the aforementioned dataset, similarly as described by Zhang *et al.* [13]. We allowed 0–3 nt mismatches or gaps between drivers and database sequences. The BLASTN parameters were adjusted to expected values of 1000 and number of descriptions and alignments of 1000. The default word-match size between the query and the database sequences was seven with a low complexity filtering ability. We also employed BLAST searches to remove sugarcane sequences similar to

tRNAs, ncRNAs (<http://biobases.ibch.poznan.pl/ncRNA>), snoRNAs (http://bioinf.scri.sari.ac.uk/cgi-bin/plant_snorna/home) or other RNAs found in the Rfam database [46].

Wherever available, precursor sequences of approximately 620 nt were extracted (300 nt upstream of and 300 nt downstream from the BLAST hits) and used for hairpin structure predictions using MFOLD3.2 algorithm [47]. Number of structures, free energy, miRNA-like helicity, number of arms per structure, size of helices within arms, and size/symmetry of internal loops within arms were analyzed by our in-house MIRcheck-based script [37], following manual inspection. RNA sequences were considered miRNA precursor candidates only if they fitted the following criteria: (1) the RNA sequence could fold into an appropriate stem-loop hairpin secondary structure; (2) mature miRNA site was located in one arm of the hairpin structure; (3) the mature miRNA sequence was located in the same arm of the hairpin as its homolog in other plant species; (4) mature miRNA had six or fewer, and one or more, mismatches with the miRNA* sequence in the opposite arm; (5) no break in miRNA* sequences; (6) predicted secondary structures had MFEI values higher than 0.65 [12, 19], negative MFEs, and 30–70% G + C contents; (7) two base pairs of maximum consecutive mismatches between miRNA and miRNA*; (8) a minimum of two bases pairing after the alignment between the predicted miRNA sequence and its opposite miRNA* sequence within the secondary structure; (9) and a final stem loop with a minimum of 60 nt.

Predicting sugarcane miRNA targets

Sugarcane miRNA mature sequences were used to BLAST search for possible gene targets present in the SoGI database and available BAC sequences. To minimize the number of false positives, 21-nt miRNA sequences were initially divided into three blocks of eight (block 1), three (block 2), and 10 bp (block 3). The maximum mismatches permitted in each block for the mRNA:miRNA duplex were two, zero, and

three, respectively. To more thoroughly assess the mRNA::miRNA potential pairing, we additionally developed a more sensitive computational approach to identify target candidates. Each miRNA complementary site was scored, with perfect matches given a score of zero. Points were added for each G:U bulge (0.5), non-G:U mismatch (one), and bulged nucleotide in the miRNA or target strand (1.5). Only SoGI/BAC sequences that scored ≤ 3.5 points were further considered as potential miRNA targets. Closely related sequences were blasted against each other and analyzed. Sequences sharing $\geq 95\%$ of identity at nucleotide level were considered as one gene target.

SsCBP1 comparative sequence analysis

Comparative analysis of sugarcane SsCBP1's possible orthologous in green plants was done by constructing a phylogenetic tree containing highly similar plant sequences. A BLASTX search was performed using *SsCBP1* as query against a green plant protein dataset of 365,187 protein sequences obtained from several completed genomes (*Arabidopsis thaliana*, version 7.0 – <http://www.arabidopsis.org>; *Populus trichocarpa*, version 1.1 – http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html; *Glycine max*, version 0.1 – <http://www.phytozome.net/soybean.php>; *Oryza sativa*, version 5.0 – <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1/pseudomolecules/info.shtml>; *Sorghum bicolor*, version 1.4 – <http://genome.jgi-psf.org/Sorbi1/Sorbi1.home.html>; *Selaginella moellendorffii*, version 1.0 – <http://genome.jgi-psf.org/Selmo1/Selmo1.home.html>; *Physcomitrella patens patens*, version 1.1 – http://genome.jgi-psf.org/Phypa1_1/Phypa1_1.home.html; *Volvox carteri*, version 1.0 – <http://genome.jgi-psf.org/Volca1/Volca1.home.html>; *Chlamydomonas reinhardtii*, version 3.0 – <http://genome.jgi-psf.org/chlre3/chlre3.home.html>; *Ostreococcus lucimarinus*, version 2.0 – <http://genome.jgi-psf.org/Ostva4/Ostva4.home.html>; *Ostreococcus tauri*, version 2.0 – <http://genome.jgi-psf.org/Ostva4/Ostva4.home.html>).

psf.org/Ostta4/Ostta4.home.html; *Micromonas pusilla* CCMP1545, version 2.0 – <http://genome.jgi-psf.org/MicpuC2/MicpuC2.home.html>; *Micromonas* strain RCC299, version 2.0 – <http://genome.jgi-psf.org/MicpuN2/MicpuN2.home.html>). The conserved domains found among protein sequences were aligned using ClustalW [48] to produce ungapped alignments. The phylogenetic relationship of these aligned sequences was then constructed using the Neighbor-Joining method. Phylogenetic analysis was conducted in MEGA4 software [49]. This process allowed identifying the most probable orthologous sequences of the SsCBP1. EST sequences from barley, wheat, and sugarcane were obtained from “TIGR Plant Transcript Assemblies Database” [50], and cDNA sequences from maize were obtained from MAGI (<http://magi.plantgenomics.iastate.edu/>). The accession numbers of genes shown in Figure 5 are as follows: SsCBP1 – TC67256; SbCBP1 – Sb02g036870; ZmCBP1 – MAGlv4.0 54669; HvCBP1 – BI947163; TaCBP1 – CK217219; OsCBP1 – Os07g38290; AtCBP1 – At5g26330; VvCBP1 – Sim4.aln-TCVV023209; PtCBP1 – 821987; GmCBP1 – Gm0010x00014; GmCBP2 – Gm0133x00019; PtCBP2 – 415490; PtCBP3 – 195948; PtCBP4 – 410618; PtCBP5 – 561943; PtCBP6 – 173259; ZmCBP2 – MAGlv4.0 158060; SbCBP2 – Sb01g004320; SmCBP1 – 27471; AtCBP2 – At2g26720; AtCBP3 – At2g31050.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

ASZ and RV carried out the molecular biology studies and the bioinformatic analyzes; FAOM and MJS participated in the molecular biology studies and helped analyzing the data; FTSN, LEVB and MV carried out the phylogenetic analyzes; FTSN designed and coordinated the study, and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted to Dr. Silvana Creste Souza (Instituto Agronomico de Campinas) for providing

plant materials of *S. officinarum* and *S spontaneum*. This work was supported by the State of Sao Paulo Research Foundation, FAPESP (grant no. 07/58289-5) and partially by the National Council for Scientific and Technological Development, CNPq (grant no. 474635/2008-2).

REFERENCES

1. Nogueira FTS, Madi S, Chitwood DH, Juarez MT, Timmermans MCP: **Two small regulatory RNAs establish opposing fates of a developmental axis.** *Genes Development* 2007, **21**:750-755.

2. Chitwood DH, Nogueira FTS, Howell MD, Montgomery TA, Carrington JC, Timmermans MCP: **Pattern formation via small RNA mobility.** *Genes & Development* 2009, **23**:549-554.

3. Rubio-Somoza I, Cuperus JT, Weigel D, Carrington JC: **Regulation and functional specialization of small RNA-target nodes during plant development.** *Current Opinion in Plant Biology* 2009, **12**(5):622-627.

4. Shukla LI, Chinnusamy V, Sunkar R: **The role of microRNAs and other endogenous small RNAs in plant stress responses.** *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 2008, **1779**(11):1874-9399.

5. Ruiz-Ferrer V, Voinnet O: **Roles of Plant Small RNAs in Biotic Stress Responses.** *Annual Review of Plant Biology* 2009, **60**:485-510.

6. Guo HS, Xie Q, Fei JF, Chua NH: **MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for Arabidopsis lateral root development.** *Plant Cell* 2005, **17**:1376-1386.

7. Zhang B, Pan X, Wang Q, Cobb GP, Anderson TA: **Computational identification of microRNAs and their targets.** *Computational Biology and Chemistry* 2006, **30**(6):395-407.

8. Voinnet O: **Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs.** *Cell* 2009, **136**(4):669-687.

9. Rhoades MW, Reinhardt BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP: **Prediction of plant microRNA targets.** *Cell* 2002, **110**:513-520.

10. Zhao CZ, Xia H, Frazier TP, Yao YY, Bi YP, Li AQ, Li MJ, Li CS, Zhang BH, Wang XJ: **Deep sequencing identifies novel and conserved microRNAs in peanuts (*Arachis hypogaea* L.)**. *BMC Plant Biology* 2010, **5**:10:3

11. Lu C, Meyers BC, Green PJ: **Construction of small RNA cDNA libraries for deep sequencing**. *Methods* 2007, **43**(2):110-117.

12. Sunkar R, Jagadeeswaran G: **In silico identification of conserved microRNAs in large number of diverse plant species**. *BMC Plant Biology* 2008, **8**:37.

13. Zhang BH, Pan XP, Wang QL, Cobb GP, Anderson TA. **Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis**. *Cell Research* 2005, **15**:336-360.

14. Birch RG. 2007. **Metabolic Engineering in Sugarcane: Assisting the Transition to a Bio-based Economy**. In *Applications of Plant Metabolic Engineering*. Edited by Springer Netherlands, 2007:249-281.

15. Jannoo N, Grivet L, Chantret N, Garsmeur O, Glaszmann JC, Arruda P, D'Hont A: **Orthologous comparison in a gene-rich region among grasses reveals stability in the sugarcane polyploid genome**. *Plant Journal* 2007, **50**:574-585.

16. Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP: **A highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs**. *Plant Methods* 2007, **3**:12.

17. Lam E, Shine Jr J, Da Silva J, Lawton M, Bonos S, Calvino M, Carrer H, Silva-Filho MC, Glynn N, Helsel Z, Ma J, Richard Jr E, Souza MG, Ming R: **Improving sugarcane for biofuel: engineering for an even better feedstock**. *GCB Bioenergy* 2009, **1**:251- 255.

18. Chuck G, Cigan AM, Saeteurn K, Hake S: **The heterochronic maize mutant *Corngrass1* results from overexpression of a tandem microRNA**. *Nature Genetics* 2007, **39**:544-549.

19. Zhang BH, Pan XP, Cox SB, Cobb GP, Anderson TA: **Evidence that miRNAs are different from other RNAs.** *Cellular and Molecular Life Sciences* 2006, **63**:246-254.

20. Paterson AH, Bowers JE, Bruggmann R, Dubchak I, Grimwood J, Gundlach H, Haberer G, Hellsten U, Mitros T, Poliakov A, Schmutz J, Spannagl M, Tang H, Wang X, Wicker T, Bharti AK, Chapman J, Feltus FA, Gowik U, Grigoriev IV, Lyons E, Maher CA, Martis M, Narechania A, Otiillar RP, Penning BW, Salamov AA, Wang Y, Zhang L, Carpita NC, Freeling M, Gingle AR, Hash CT, Keller B, Klein P, Kresovich S, McCann MC, Ming R, Peterson DG, Mehboob-ur-Rahman, Ware D, Westhoff P, Mayer KFX, Messing J, Rokhsar DS: **The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses.** *Nature* 2009, **457(7229)**:551-556.

21. Notredame C, Higgins DG, Heringa J: **T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment.** *Journal Molecular Biology* 2000, **302**:205-217.

22. Lu C, Jeong DH, Kulkarni K, Pillay M, Nobuta K, German R, Thatcher SR, Maher C, Zhang L, Ware D, Liu B, Cao X, Meyers BC, Green PJ: **Genome-wide analysis for discovery of rice microRNAs reveals natural antisense microRNAs (nat-miRNAs).** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008, **105(12)**:4951-4956.

23. Piriyapongsa J, Jordan IK: **A family of human microRNA genes from miniature inverted-repeat transposable elements.** *PLoS One* 2007, **2(2)**:e203.

24. Piriyapongsa J, Jordan IK: **Dual coding of siRNAs and miRNAs by plant transposable elements.** *RNA* 2008, **14(5)**:814-21.

25. Zhang L, Chia JM, Kumari S, Stein JC, Liu Z, Narechania A, Maher CA, Guill K, McMullen MD, Ware D: **A Genome-Wide Characterization of MicroRNA Genes in Maize.** *PLoS Genetics* 2009, **5(11)**:e1000716.

26. Allen E, Xie Z, Gustafson AM, Sung GH, Spatafora JW, Carrington JC: **Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana*.** *Nature Genetics* 2004, **36**:1282-1290.

27. Xie F, Frazier TP, Zhang B: **Identification and characterization of microRNAs and their targets in the bioenergy plant switchgrass (*Panicum virgatum*).** *Planta* 2010, **232**(2):417-434.
28. Yao Y, Guo G, Ni Z, Sunkar R, Du J, Zhu JK, Sun Q: **Cloning and characterization of microRNAs from wheat (*Triticum aestivum* L.).** *Genome Biology* 2007, **8**(6):R96.
29. Unver T, Budak H: **Conserved microRNAs and their targets in model grass species *Brachypodium distachyon*.** *Planta* 2009, **230**:659–669.
30. Song C, Fang J, Li X, Liu H, Thomas Chao C: **Identification and characterization of 27 conserved microRNAs in citrus.** *Planta* 2009, **230**:671–685.
31. Ha M, Lu J, Tian L, Ramachandran V, Kasschau KD, Chapman EJ, Carrington JC, Chen X, Wang XJ, Chen ZJ: **Small RNAs serve as a genetic buffer against genomic shock in Arabidopsis interspecific hybrids and allopolyploids.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009, **106**:17835-17840.
32. Nogueira FTS, Chitwood DH, Madi S, Ohtsu K, Schnable PS, Scanlon MJ, Timmermans MC: **Regulation of small RNA accumulation in the maize shoot apex.** *PLoS Genetics* 2009, **5**:e1000320.
33. Ovcharenko I, Boffelli D, Loots GG: **eShadow: a tool for comparing closely related sequences.** *Genome Research* 2004, **14**:1191-1198.
34. Chang WC, Lee TY, Huang HD, Huang HY, Pan RL: **PlantPAN: Plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene groups.** *BMC Genomics* 2008, **26**:561.
35. Vaucheret H, Fagard M: **Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators.** *Trends in Genetics* 2001, **17**(1):29-35.
36. Warthmann N, Das S, Lanz C, Weigel D: **Comparative Analysis of the *MIR319a* MicroRNA Locus in**

Arabidopsis and Related Brassicaceae. *Molecular Biology and Evolution* 2008, **25(5)**:892-902.

37. Jones-Rhoades MW, Bartel DP: **Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA.** *Molecular Cell* 2004, **14**:787-799.

38. Llave C, Kasschau KD, Rector MA and Carrington JC: **Endogenous and silencing-associated small-RNAs in plants.** *Plant Cell* 2002, **14**:1605-1619.

39. Sunkar R, Girke T, Jain PK, Zhu JK: **Cloning and characterization of microRNAs from rice.** *Plant Cell* 2005, **17**:1397-1411.

40. Adai A, Johnson C, Mlotshwa S, Archer-Evans S, Manocha V, Vance V, Sundaresan V, **Computational prediction of miRNAs in Arabidopsis thaliana.** *Genome Research* 2005, **15**:78-91.

41. Axtell, M.J., and Bowman, J.L: **Evolution of plant microRNAs and their targets.** *Trends Plant Sci* 2008, **13**: 343–349.

42. Ding D, Zhang L, Wang H, Liu Z, Zhang Z, Zheng Y: **Differential expression of miRNAs in response to salt stress in maize roots.** *Annals of Botany (London)* 2009, **103**:29-38.

43. Vincentz M, Bandeira-Kobarg C, Gauer L, Schlögl P, Leite A: **Evolutionary pattern of angiosperm bZIP factors homologous to the maize Opaque2 regulatory protein.** *Journal of Molecular Evolution* 2003, **56(1)**:105-116.

44. Iskandar HM, Simpson RS, Casu RE, Bonnett, GD, MacLean DJ, Manners JM: **Comparison of Reference Genes for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis of Gene Expression in Sugarcane.** *Plant Molecular Biology Reporter* 2004, **22**:325-337.

45. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ: **miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature.** *Nucleic Acids Research* 2006, **34**:D140-D144.

46. Gardner PP, Daub J, Tate JG, Nawrocki EP, Kolbe DL, Lindgreen S, Wilkinson AC, Finn RD, Griffiths-Jones S, Eddy SR, Bateman A: **Rfam: Updates to the RNA families database**. *Nucleic Acids Research* 2009, **37**:D136-140.
47. Zuker M: **Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction**. *Nucleic Acids Research* 2003, **31(13)**:3406-3415.
48. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice**. *Nucleic Acids Research* 1994, **22**:4673-4680.
49. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S: **MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0**. *Molecular Biology and Evolution* 2007, **24(8)**:1596-1599.
50. Childs KL, Hamilton JP, Zhu W, Ly E, Cheung F, Wu H, Rabinowicz PD, Town CD, Buell CR, Chan AP: **The TIGR Plant Transcript Assemblies database**. *Nucleic Acids Research* 2007, **35**:D846–D851.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. New sorghum miR827 precursor is highly similar at sequence and secondary structure levels with its sugarcane homolog. **(A)** Partial multiple sequence alignment of miR827 precursors from *Saccharum spp* (Ss), *Sorghum bicolor* (Sb), *Oryza sativa* (Os), *Zea mays* (Zm), *Brachypodium distachyon* (Bd), *Arabidopsis thaliana* (At), and *Populus trichocarpa* (Pt). Sequence alignment was performed using the T-Coffee program [21]. Black line on top of the alignment indicates the mature miRNA sequence. **(B)** Conserved secondary stem-loop structures of pre-miR827 in sugarcane (Ss) and sorghum (Sb). Red line marks the mature miR827 sequence.

Figure 2. Partial conservation of mature miR1128 among sugarcane, switchgrass, and wheat. Multiple sequence alignment of sugarcane pre-miRNA1128 (*SsMIR1128*) with its homologs in switchgrass (Pv) and wheat (Ta). The alignment was done using the T-Coffee program. Black line indicates the mature miR1128 while gray line indicates the miR1128* sequence.

Figure 3. Expression profiles of miRNAs in sugarcane organs/tissues. **(A)** Stem-loop pulsed RT-PCR of SsmiRNAs in organs/tissues of sugarcane hybrid RB 83-5486. **(B)** Stem-loop pulsed RT-PCR of SsmiRNAs in organs/tissues of the *S. officinarum* and *S. spontaneum*. *Saccharum spp. GAPDH* (*SsGAPDH*; TC77224) was used as a loading control. RT- (reaction without RT) and PCR- (reaction without cDNA) are shown as negative controls. Numbers in parentheses represent PCR cycles for each amplicon.

Figure 4. Conserved elements in the *MIR1432* locus of sugarcane, sorghum, and maize. eShadow plot shows the HMMI (Hidden Markov Model Islands) predictions (in beige) of potential evolutionary conserved regions along the *SsMIR1432* locus compared with its sorghum and maize counterparts. Purple

plot bars represent the conserved regions (sliding window size of 35 bp). Red bars in the plot indicate the sugarcane mature miR1432 (left) and miR1432* (right) positions. The arrow on the top of the plot represents the pre-miR1432 position. The x axis represents nucleotide length of the sequence while the y axis represents the percentage of nucleotide variation. Bars underneath the plot mark putative CpG/CpNpG islands present in the *SsMIR1432* locus (light gray), *SbMIR1432* locus (black), and *ZmMIR1432* locus (dark gray). A putative auxin response element (AuxRE) is shown on the top of the plot as an example of a highly conserved TFB site among these three loci.

Figure 5. *SsCBP1* is a target of the monocot-specific miR528. **(A)** Stem-loop pulsed RT-PCR to detect miR528 transcripts in tissues of sugarcane, sorghum, maize, rice, and *Arabidopsis*. The highly conserved miR156 was used as an internal control. **(B)** Mapping of *SsCBP1* mRNA cleavage sites by RNA ligase-mediated 5'RACE. Top panel shows the 4% agarose gel containing the expected 160 nt amplicon using specific reverse primers of *SsCBP1* and RNA ligase-mediated 5'RACE primers. Bottom panel depicts the miR528-complementary site in the target mRNA and the miRNA. Watson–Crick pairing (vertical dashes) is indicated. Arrows indicate the 5' termini of mRNA fragments isolated from sugarcane, as identified by cloned 5'RACE products, with the frequency of clones shown. **(C)** Inferred phylogenetic relationships among *SsCBP1* orthologous. p-distances were calculated from amino acid alignments of conserved blocks, and tree topology was inferred with the Neighbor-Joining method. The red branches show the monocot group of CBP genes containing the predict target site for miR528. This monocot group of genes belongs to a possible group of angiosperm orthologs (PoGO A). None of the eudicot sequences within this PoGO contain miR528 predicted target site. The 10 most closely related sequences out of PoGO A were included in this analysis. Only bootstraps values higher than 50% are shown for 1000 replicates. Sequence references are given in Methods.

Figure 3.

Figure 4.

Figure 5.

Anexo B – Iniciadores *RT–stem loop* para detenção de seqüências maduras de miRNAs analisados

MicroRNA	Seqüência iniciador 5´- 3´
miRNA156	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTGCTCT
miRNA529	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAGGCTG
miRNA159	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGAAGAGCT
miRNA319	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGAGGGAGC

Anexo C – Iniciadores específicos para amplificação da seqüência madura de miRNAs.

miRNAs	Iniciador	Seqüência 5´- 3´
miRNA156	Direto	CCTGAGTGACAGAAGAGAGTG
miRNA529	Direto	CCTGAGAGAAGAGAGAGAGTA
miRNA159	Direto	GCGGCGTTGGATTGAAGGG
miRNA319	Direto	GCGGCGTTGGACTGAAGGGT
Reverso Universal	Reverso	GTGCAGGGTCCGAGG

Anexo D – Iniciadores específicos para amplificação de genes selecionados

Gene	Iniciador	Seqüência 5´ - 3´
<i>SsSPL1</i>	Direto	CCCCCCAGGTGGATGTCT
	Reverso	TTGACAGAAGAGAGAGAGCACAGC
<i>SsGAPDH</i>	Direto	TTTGAATGGCAAGCTCACTG
	Reverso	GGTGGAAACCAAATCCTCCT
<i>Ssactina</i>	Direto	CTTAGGTTGGATCTTGCTGG
	Reverso	TTAGAAGCATTTTCGGTGGAC
<i>SsRPL35.4</i>	Direto	CTGAAGACGGAGAGGGAAAA
	Reverso	GGCGAAGAGAAACTAACAC
<i>SsRibossomal 25S</i>	Direto	ATAACCGCATCAGGTCTCCAAG
	Reverso	CCTCAGAGCCAATCCTTTTCC
<i>SsTb1</i>	Direto	AAGGCGAGGGAGAGGGCGA
	Reverso	CGTCAATTGCTGATGCAAGCTTTAC
<i>SsAXL</i>	Direto	AAGCTGGTCACCAAGCAGTT
	Reverso	GGAGTAGGTGTTTGGGTTGC
<i>SsPIN1-like</i>	Direto	CGCTCATGCTCTTCATGTTC
	Reverso	ACGTGTATCTTGCCGTCCTC
<i>GAMyB</i>	Direto	TGGCAGCCATGCCTTTTTTA
	Reverso	GGCGATGCACACTCAGATT
<i>knotted1</i>	Direto	TGACCTGAAGCAAATCAACAACTG
	Reverso	CGTGGTGTGAAATGGAAGCATC
<i>DCL1</i>	Direto	CTGCCCATGCCAAAAGATT
	Reverso	CATCAGGCTTGTCACGGTAA
<i>ERF3</i>	Direto	GTGCTGTCTGAGTCGTCGTC
	Reverso	GGGTCCATGAACACCTGGTA
<i>SsMIR156b/c</i>	Direto	CCAGAGATAAACCAATCTCTAGATCTGTCT
	Reverso externo	CCCGACATTGAGATCCACATGTTAATCATA
	Reverso interno	TAATAGTCACTCTCCCTCGCTCTC
<i>UBi-Intron</i>	Direto	TTGATGTGGGTTTTACTGATGC
<i>npt-II</i>	Direto	CTGTGCTCGACGTTGTCACT
	Reverso	AGCCAACGCTATGTCCTGAT

Anexo E - Iniciadores específicos utilizados no protocolo do método 5'RACE modificado

Iniciador	Seqüência 5' - 3'
Gene Racer 5'	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA
Gene Racer 5'Nested	GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA
SsGAMyB externo reverso PCR1	GAAAGAACCCGGGCTGTTCTTCCCAAT
SsGAMyB interno reverso PCR2	TGAACTTCGGACCGATGGTTGTTGGT
SsSPL1 externo reverso PCR1	TGTTAAGTGATTGGCATTTCAGG
SsSPL1 interno reverso PCR2	GTGCCACAGGGTTGCCGTC