

AUGUSTO CESAR CRIVELLARI

Prospecção por Bioinformática de pequenos RNAs na  
relação de fungos fitopatogênicos e seus hospedeiros

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisador Tecnológicas para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo

2019

AUGUSTO CESAR CRIVELLARI

Prospecção por Bioinformática de pequenos RNAs na  
relação de fungos fitopatogênicos e seus hospedeiros

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisador Tecnológicas para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Marie-Anne Van Sluys

Versão original

São Paulo

2019

## RESUMO

CRIVELLARI, A. C. **Prospecção por Bioinformática de pequenos RNAs na relação de fungos fitopatogênicos e seus hospedeiros**. 2019. 131 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Pesquisadores demonstraram que o fungos podem produzir pequenos RNAs papel relevante no processo de estabelecimento de uma infecção em seu hospedeiro, suprimindo a expressão de proteínas relevantes ao hospedeiro, sugerindo que não somente proteínas poderiam agir como efetoras no estabelecimento da infecção. O presente trabalho prospectou em 27 genomas de fungos patogênicos de relevância comercial, retrotransposons que serviram de base para passos de busca, por análise de semelhança, de possíveis pequenos RNAs efetores. Também foi averiguado nos genomas de fungos escolhidos a presença de enzima relevantes no processamento de pequenos RNAs como a Argonauta e Dicer. Ficou claro que não há aparente relação na presença e distribuição das enzimas do maquinário de processamento de mirRNAs e as estratégias ecológicas de cada fungos. A análise de semelhança utilizada no alinhamento dos retrotransposons encontrados nos genomas dos fungos e os genomas das plantas hospedeiras de cada fungo, foi capaz de encontrar 210 sequências distintas de pequenos RNAs, os quais apresentaram 109 ocorrências de alinhamentos contra genes relacionado à defesa vegetal. Estas sequências encontradas, a presença de proteínas associadas ao processamento de pequenos RNAs nos fungos estudados e o *locus* de inserção destes pequenos RNAs no retrotransposons estudados, indicam que a estratégia deste trabalho foi bem-sucedida em encontrar potenciais pequenos RNAs, que poderiam apresentar uma função interespecífica. Entretanto, este trabalho se beneficiaria da ampliação do universo amostral para confirmação estatística dos dados apresentados.

**Palavras chave:** Fungos fitopatogênicos, Retrotransposons, pequenos RNAs não-codificantes, Argonauta e Dicer.

## ABSTRACT

CRIVELLARI, A. C. **smallRNA bioinformatics to surveil the relationship between pathogenic fungi and its hosts**. 2019. 131 p. Tese (Ph. D. thesis in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Researchers have demonstrated that fungi can produce small RNAs that are relevant in the process of establishing an infection in their host, suppressing the expression of relevant proteins to the host, suggesting that not only proteins could act as effectors in the establishment of an infection. The present work prospected in 27 genomes of pathogenic fungi of commercial relevance, retrotransposons that served as a basis for search steps, by analysis of similarity, of possible small effector RNAs. It was also verified in the selected fungi genomes the presence of enzymes relevant in the processing of small RNAs such as Argonata and Dicer. It was clear that there is no apparent relationship in the presence and distribution of the miRNA processing machinery enzymes and the ecological strategies of each fungi. The analysis of similarity used in the alignment of the retrotransposons found in the genomes of the fungi and the genomes of the host plants of each fungus, was able to find 210 distinct sequences of small RNAs, which presented 109 loci related to plant immunity. These sequences, the presence of proteins associated to the processing of small RNAs in the fungi studied and the locus of insertion of these small RNAs in the studied retrotransposons, indicate that the strategy of this work was successful in finding small RNAs, which could present an interspecific function. However, an expanded data set could provide statistical confidence to the data.

Keywords: Fitopatogenic Fungi, Retrotransposons, small non-coding RNAs, Argonaute e Dicer.

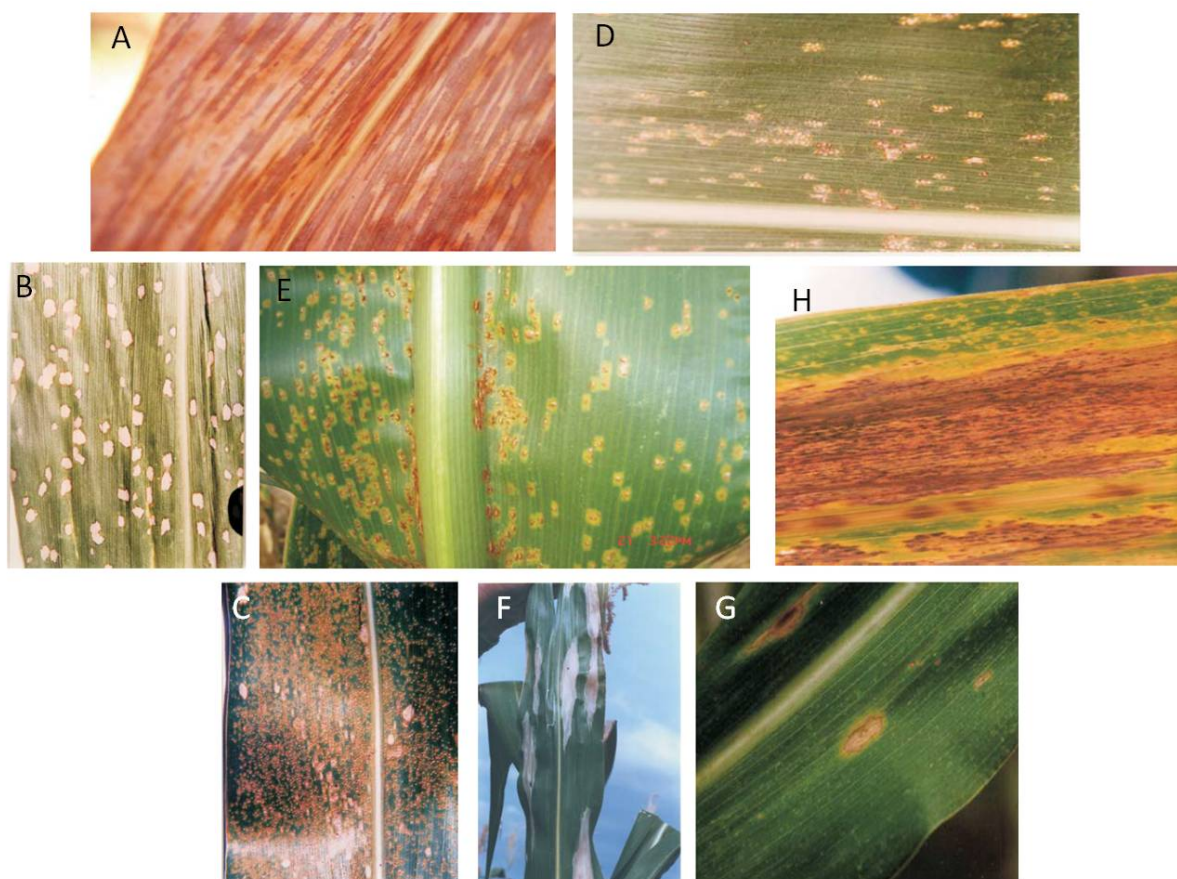
# 1. Introdução Geral

## 1.1 Segurança alimentar e relevância econômica dos fungos

A população humana deve atingir a marca de 9 bilhões ainda neste século e, entre outros desafios, urge manter a capacidade de alimentação, sem deixar de lado a preservação do meio ambiente e das coberturas naturais do solo. É essencial que as áreas agricultáveis sejam de um lado sustentáveis e também maximizem seu potencial produtivo. Ao longo das últimas décadas, o avanço da tecnologia no campo possibilitou à CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) prever a marca de produção de 198 milhões de toneladas de grãos (milho, soja, arroz, e outros) em 2014 e estimar uma safra de 238 milhões em 2018. Considerando a produtividade que o Brasil possuía em 1976, a área que deveria ser somada à área cultivada atualmente para atingirmos a mesma marca de produção seria da ordem de 100 milhões de hectares ([www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br)). As técnicas modernas de melhoramento de plantas e transgenia, possibilitaram que o potencial produtivo das culturas permanecesse em uma curva ascendente no período. Entretanto, uma planta exposta ao ambiente está sujeita a diversos fatores que influenciam o seu fenótipo, bem como a produtividade.

Doenças causadas por fungos podem causar perda parcial ou total da produção, uma vez que afetam diversos órgãos da planta. O decréscimo da capacidade produtiva está, geralmente, associado à diminuição da atividade fotossintética e obstrução dos vasos condutores que permitem a distribuição dos fotossintatos às diferentes partes da planta. Por sua vez, estes efeitos prejudicam a produção de flores, frutos e sementes, reduzindo a produtividade da cultura (Morales et al. 2012).

Doenças fúngicas popularmente conhecidas como “ferrugem” em soja (*Phakopsora pachyrhizi*, *Phakopsora striiformis*, *Uromyces appendiculatus*, *Uromyces fabae* e *Melampsora lini*), podem provocar perdas de produção na ordem de 80% (Tremblay et al., 2013). Já na cultura do milho, a EMBRAPA em sua Circular Técnica 83 de 2006, estimou perdas que variam entre 44 e 80% dependendo das condições ambientais e do manejo da cultura, bem como de quais agentes etiológicos são responsáveis pela infecção (Figura 1).



**Figura 1 - Exemplos de doenças foliares em milho. Adaptado da Circular Técnica 86 de 2006 da EMBRAPA (EMBRAPA, 2006). A- Cercosporiose (*Cercospora zea-maydis*); B - mancha branca (*Pantoea ananas*); C - Ferrugem polissora (*Puccinia polysora*); D - ferrugem branca (*Physopella zae*); E - ferrugem comum (*Puccinia sorghi*); F - helmintosporiose (*Exserohilum turcicum*); G - mancha de diploidia (*Stenocarpella macrospora*); H - Antracnose (*Colletotrichum graminicola*).**

Para exemplificar o impacto de algumas culturas para a economia, tomamos o exemplo da soja. A soja é atualmente o principal item de exportação do agronegócio brasileiro, representando em 2013 um volume de 43 milhões de toneladas de grãos (desconsiderando a exportação de farelo de soja), somando 23 bilhões de dólares em divisas (Agencia Nacional de Exportação de Cereais – ANEC – [www.anec.com.br](http://www.anec.com.br)). Sendo assim, o conhecimento gerado sobre fungos fitopatogênicos e sua relação com seus hospedeiros, possui uma profunda importância para a segurança alimentar do planeta e a economia brasileira.

### **1.1.1 Sistema Imune – As plantas contra-atacam: PTI & ETI**

Em 2011, o número de fungos descritos somava 99 mil espécies, com um potencial predito de 1200 novas espécies a serem descobertas todos os anos (Blackwell 2011; Kirk et al. 2008), dos quais estima-se que 10% do total vivem em associação com plantas (Knogge, 1996). Esta associação pode constituir em uma relação simbiótica, ou uma relação patogênica, sendo os fungos patogênicos aqueles responsáveis por parte importante das perdas agrícolas. Os fungos podem ser classificados segundo sua estratégia ecológica: biotróficos, são aqueles organismos que se alimentam de outros organismos enquanto vivos, ou por meio dos mesmos; necrotróficos, onde o organismo se alimenta de partes mortas de um organismo vivo, ou mesmo de organismos mortos; ou ainda hemibiotróficos, onde em determinadas condições, ou momentos do ciclo de vida, o fungo pode alternar a estratégia biotrófica ou necrotrófica.

Tanto fungos biotróficos, quanto fungos simbiontes, dependem de sua planta hospedeira para fechar seu ciclo de vida. As interações entre plantas e fungos é diversa, e ainda pouco compreendida, justificando-se a necessidade de identificar novos elementos associados à interação.

Plantas, diferentemente de mamíferos, não possuem células móveis de defesa, tampouco um sistema imune somático adaptativo. Cada uma das células vegetais precisa ter a capacidade de se defender de forma autônoma. O sistema imune de plantas pode ser dividido entre dois tipos de resposta imune: a PTI (do inglês: PAMPs Triggered Immunity) e ETI (do inglês: Effectors Triggered Immunity).

A primeira linha de defesa inata das plantas constitui na identificação por meio dos receptores denominados PRRs (do inglês: Pattern Recognition Receptors) presentes na membrana celular, de padrões moleculares denominados PAMPs (do inglês: Pathogen-associated Molecular Patterns). Esta resposta é denominada PTI (do inglês: PAMPs-triggered immunity). Os PAMPs são moléculas essenciais para os organismos invasores, tais como a flagelina presente em bactérias (Selin et al., 2016) ou a quitina em fungos (Stergipoulos & Wit, 2009; Dodds & Rathjen, 2010). Estes padrões são conservados, portanto não diferem em sua estrutura entre diferentes potenciais invasores (Dodds & Rathjen, 2010). A identificação dos PAMPs por meio dos

PRRs dispara a ativação de mecanismos de defesa que constituem um contra-ataque às moléculas e proteínas críticas dos processos fisiológicos dos fungos (Selin et al., 2016). Organismos controlados após a resposta imune disparadas por PTI, são considerados não hospedeiros para aquela planta. A vasta maioria dos microrganismos se encaixa nesta categoria (Ownley & Trigiano, 2017).

Para suprimir a resposta imune do tipo PTI, e manipular a resposta fisiológica das plantas hospedeiras, os fungos patogênicos secretam proteínas efetoras (Stergipoulos & Wit, 2009; de Jonge et al., 2011; Giraldo & Valent, 2013). São considerados patógenos, aqueles capazes de produzir proteínas efetoras capazes de suprimir o sistema imune da planta hospedeira. Tais proteínas interferem na capacidade da planta de detectar ou responder às PAMPs, resultando no estabelecimento da doença por meio da interferência na primeira linha de defesa da planta a PTI. Cerca de 83 proteínas efetoras foram descritas até o momento (Selin et al., 2016), e sua função e alvos não foram completamente elucidados.

Entretanto, as plantas são capazes de detectar as proteínas efetoras produzidas por um patógeno. A ETI (do inglês: Effectors-Triggered Immunity) consiste em uma resposta do tipo PTI amplificada e acelerada (Dodds & Rathjen, 2010). As proteínas R (serão discutidas à frente) podem apresentar domínios polimórficos NB (do inglês: Nucleotide Binding) e LRR (do inglês: Leucine-Rich Repeats) entre outros, e, sendo capazes de detectar efetores, disparam a resposta imune (Dodds & Rathjen, 2010) do tipo ETI. A imunidade intermediada por proteínas NB-LRR é eficaz contra organismos biotróficos e hemibiotróficos, porém não é eficaz contra organismos necrotróficos (Glazebrook, 2005), pois a resposta do tipo ETI pode culminar com a morte das células/tecidos atacadas pelo patógeno, o que não representa um empecilho aos fungos necrotróficos (Jones & Dangl, 2006) que justamente obtêm sua nutrição a partir de tecidos mortos. As respostas imunes vegetais geradas por PTI e ETI são similares, porém além de mais rápidas e de maior amplitude, geralmente a ETI culmina com uma resposta de hipersensibilidade (do inglês: Hypersensitive Response) ocasionando a morte da célula vegetal (Dodds & Rathjen, 2010).

A Figura 2 apresenta um esquema resumindo o funcionamento do sistema imune vegetal.



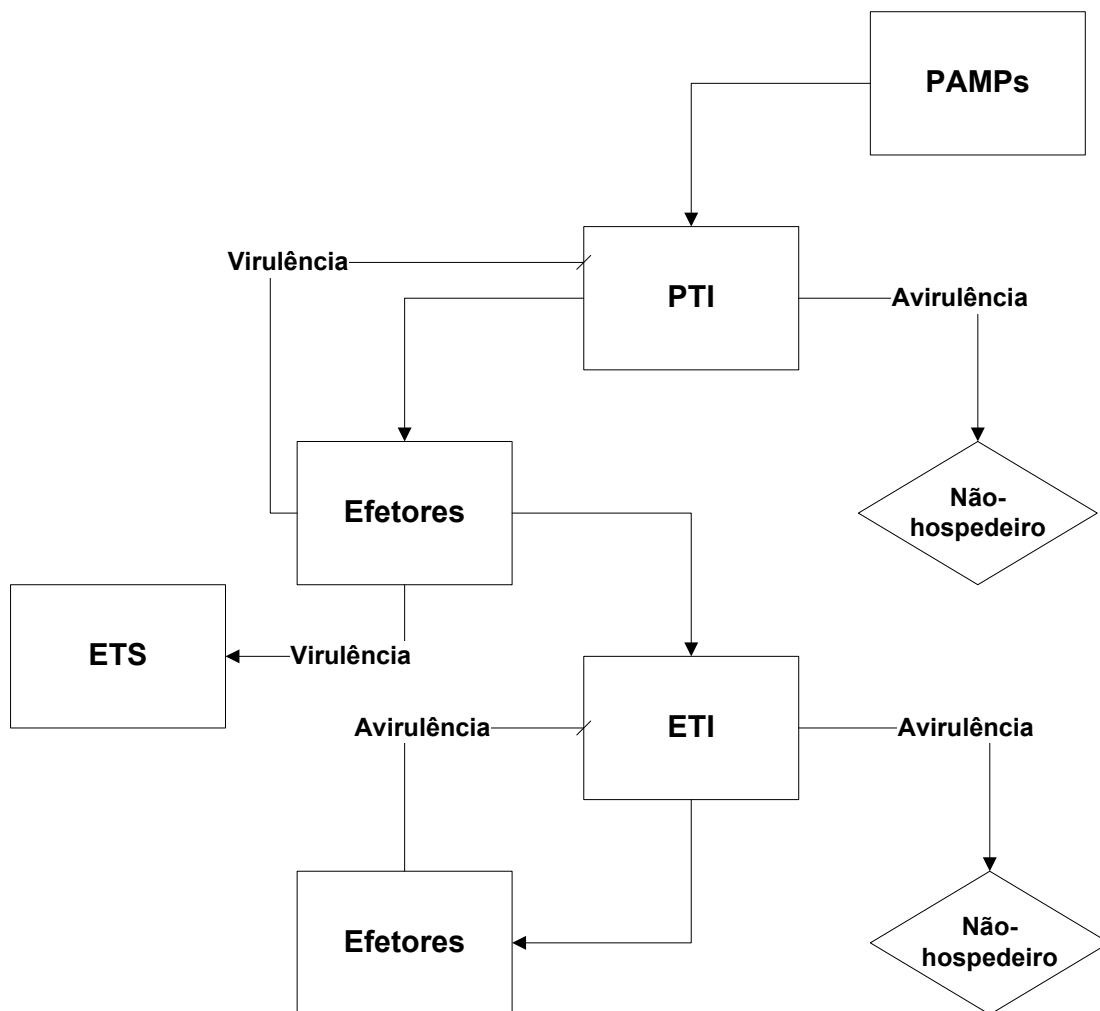
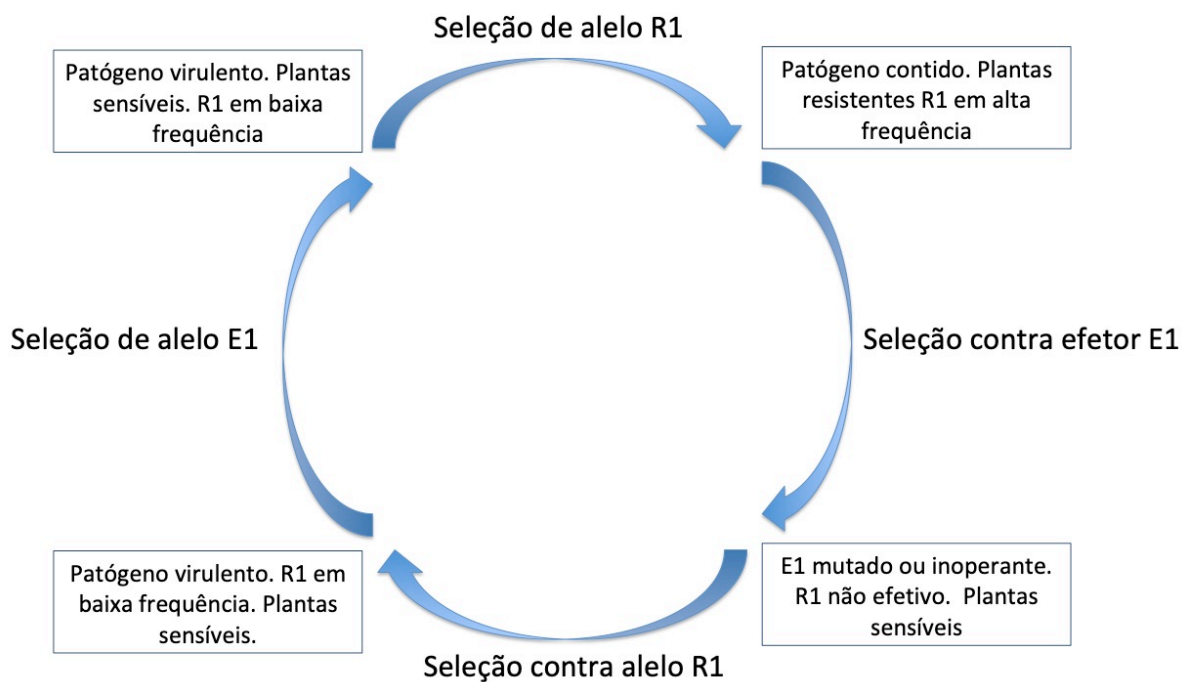


Figura 2 - O sistema imune de plantas pode ser dividido entre dois tipos de resposta imune: a PTI (*PAMPs Triggered Immunity*) e ETI (*Effectors Triggered Immunity*). A primeira linha de defesa das plantas constitui na identificação por meio dos receptores denominados PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) presentes na membrana celular, de padrões moleculares denominados PAMPs (*Pathogen-associated Molecular Patterns*). Organismos controlados após a resposta imune disparadas por PTI, são considerados não hospedeiros para aquela planta (Avirulência - Não hospedeiro). Para suprimir a resposta imune do tipo PTI, e manipular a resposta fisiológica das plantas hospedeiras, os fungos patogênicos secretam proteínas efetoras. São considerados patógenos, aqueles capazes de produzir proteínas efetoras capazes de suprimir o sistema imune da planta hospedeira (Virulência - ETS - *Effector Triggered Susceptibility*). Tais proteínas interferem na capacidade da planta de detectar ou responder às PAMPs, resultando no estabelecimento da doença por meio da interferência na primeira linha de defesa da planta a PTI. As plantas são capazes de detectar as proteínas efetoras produzidas por um patógeno resultando em uma ETI, portanto os organismo também é considerado não hospedeiro daquela planta (Avirulência - ETI - *Effector Triggered Immunity*). Os dois losangos indicam as instâncias, onde uma vez debelado o patógeno por meio de uma resposta do tipo PTI, ou ETI, aquela planta será considerada não-hospedeira daquele patógeno invasor.

### 1.1.2 Ação de Proteínas R e Efetores

O processo de seleção natural favorece os patógenos que possuem efetores que não são reconhecidos pelas NB-LRR das plantas, possibilitando que tal organismo drible o sistema imune vegetal. Entretanto, a mesma pressão de seleção, favorece a seleção de plantas que possuem proteínas capazes de anular a ação destes, resultando em uma resposta imune, reiniciando o processo e estabelecendo um ciclo entre as plantas e seus potenciais patógenos (Figura 3).



**Figura 3 - Ciclo resultante da interação entre plantas e seus patógenos. Um patógeno carrega um gene efetor (E1) que é reconhecido por um alelo raro R1 presente em seu hospedeiro. Este alelo R1 é então selecionado, aumentando sua frequência na natureza, ocasionando a redução da frequência do alelo E1 e seleção de variantes mutadas (topo e direita do esquema). A efetividade do R1 então é reduzida, uma vez que as variantes de E1 não são mais reconhecidas por R1. Considerando que R1 possui um custo adaptativo, o mesmo passa a ser negativamente selecionado, reduzindo sua frequência na população. Nesta condição, a população de patógenos que possui a variante original de E1, passa a ser selecionada, em virtude da menor pressão de R1 na população do hospedeiro, então sua frequência passa a subir na população de patógenos (parte baixa e esquerda do esquema). Em populações de plantas e fungos, este processo ocorre continuamente para uma enorme quantidade de genes R (plantas) e genes E (fungos).**

O reconhecimento da presença de efetores é essencial para o estabelecimento de uma resposta imune. Plantas evoluíram no sentido de

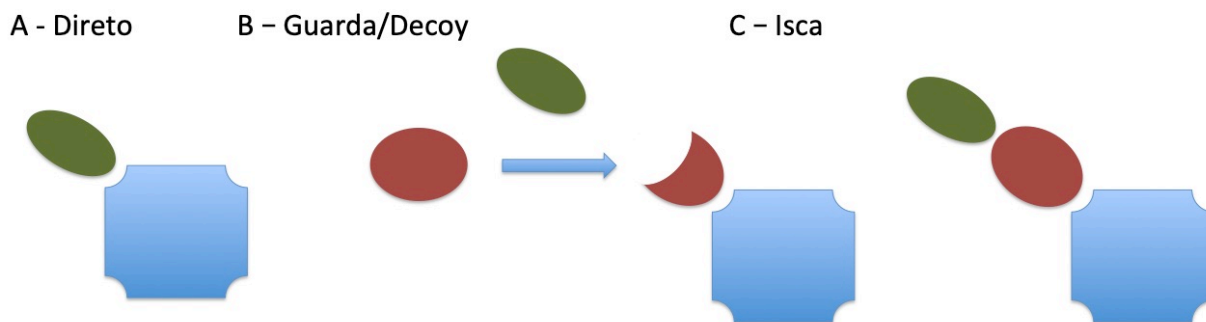
reconhecer e responder a moléculas produzidas por patógenos, levando a uma rápida ativação de suas defesas (Glazebrook, 2005). O conceito “gene-a-gene” foi proposto antes mesmo do advento das técnicas de biologia molecular, e hipotetizam que patógenos carregando genes dominantes denominados gene de avirulência (do inglês: Avirulence genes) provoca uma resposta imune em plantas hospedeiras que carregam genes dominantes denominados genes “R” (do inglês: Resistance genes) (Dodds & Rathjen, 2010; ). Deste fenômeno estabeleceu-se a nomenclatura “interação gene-a-gene” e boa parte do melhoramento genético que visa a introdução de resistência em cultivares de relevância agroeconômica se baseia neste conceito e na identificação de genes “R”. Patógenos reconhecidos dessa maneira, e portanto, não obtém sucesso no desenvolvimento da doença, são denominados patógenos avirulentos (do inglês: avirulent pathogens), o hospedeiro é denominado resistente e a interação é considerada incompatível. Já na ausência de reconhecimento por parte do hospedeiro, devido a falta do gene “R” observa-se o desenvolvimento da doença e o patógeno é reconhecido como virulento, o hospedeiro é susceptível e a interação considerada compatível (Dodds & Rathjen, 2010; Ownley & Triano, 2017).

Diversos genes R foram identificados e estão compreendidos principalmente na classe NB-LRR (Belkhadir et al., 2004) situando estas proteínas como essenciais na imunidade do tipo ETI. Em alguns casos o produto da expressão dos genes R interage diretamente com proteínas efetoras (Dodds & Rathjen, 2010). Entretanto, o produto de expressão dos genes R pode não se ligar diretamente a um gene de avirulência porém pode ser responsável por detectar alterações em proteínas do hospedeiro, que por sua vez são decorrentes da presença dos efetores do patógeno. (Van der Biezen et al., 1998). Este conceito é conhecido como “guard model” (Wit, 2002).

Esse modelo pode ser exemplificado pela proteína RIN4 de *Arabidopsis thaliana*. Essa proteína é guardada pelas proteínas R RPM1 e RPS2 conferindo resistência à *Pseudomonas syringae pv tomato* DC3000 (Jones & Dangl 2006). No caso da proteína RMP1, o efector avrRpm1, provoca a fosforilação da proteína RIN4, tal modificação ativa a proteína RPM1, promovendo uma resposta hipersensitiva. Já no exemplo envolvendo a proteína RPS2, quando o efector

AvrRPT2 cliva a proteína RIN4 a proteína R RPS2 é ativada e promovendo a resposta hipersensitiva. Nos dois exemplos, a interação da proteína RIN4 com as proteínas R RPM1 e RPS2, possibilitou o disparo de uma resposta hipersensitiva, exemplificando o “guard model”. Este modelo biológico explica, porque um mesmo gene R poderia detectar mais de um efetor, pois diferentes efetores podem ter um mesmo alvo (neste exemplo, RIN4), ativando a mesma proteína guarda. A pressão evolutiva sobre RIN4 é diferente na presença e na ausência do complexo RPS2 e RPM1. Na presença do complexo, a eficiência de reconhecimento e ligação é essencial para disparar a resposta de resistência. Contudo na ausência do complexo, a tendência da pressão evolutiva é na direção oposta, qual seja, evitar o reconhecimento e ligação que resulta na degradação de RIN4.

O modelo “Decoy”, proposto por Hoorn & Kamoun (2008), consolida o conceito da existência de proteínas que servem como isca e desencadeiam a ativação das proteínas R. As proteínas isca, podem ser selecionadas evolutivamente no sentido de incrementar sua interação com o efetor atuando na percepção do efetor, e a proteína que de fato irá disparar a resposta imune, pode ser selecionada no sentido de minimizar sua interação com o efetor, sendo ativada quando a primeira proteína interage com o efetor. A Figura 4 ilustra a interação entre as proteínas R, as proteínas Decoy e as proteínas efetoras. Cabe notar que estes modelos estão baseados em exemplos específicos onde ainda há lacunas no conhecimento. Estes modelos diversos não são capazes de explicar todo o universo de interações entre as proteínas R e os efetores produzidos pelos patógenos (Dodds & Rathjen, 2010).



**Figura 4 - Receptores LRR reconhecem efetores de patógenos através de mecanismos diretos e indiretos. A - no reconhecimento direto efetor (verde) dispara o sistema imune ligando-se ao receptor (azul). B - no modelo guarda/decoy, o efetor modifica uma proteína acessório (vermelho), a qual pode constituir no alvo do efetor (guarda) ou então mimetizar o alvo (decoy). Por sua vez, a proteína acessória (vermelho) liga-se ao receptor (azul). C - no modelo isca, uma proteína acessória (vermelho), promove a interação da proteína efetora (verde) com o receptor (azul).**

Uma vez que o reconhecimento da presença de um efetor se estabelece, tal reconhecimento e subsequente ativação das cascatas de sinalização da defesa em plantas, culminam com duas respostas: a rápida produção de ROS (do inglês: reactive oxygen species) e a HR, que induz um processo de morte celular programada (Glazebrook, 2005).

Algumas das respostas que seguem os processos de detecção de motivos moleculares (PTI) ou efetores (ETI), são melhores conhecidos do que o próprio mecanismo de detecção (Dodds & Rathjen, 2010). O ácido salicílico (AS) e ácido jasmônico/etileno (AJ/ET), são reguladores hormonais importantes que medeiam a expressão de genes relacionados à defesa vegetal. De modo geral, as duas rotas atuam de forma antagonista, onde AS está mais relacionado à resistência contra patógenos biotróficos, por meio das respostas envolvendo HR e morte celular programada, enquanto AJ/ET está mais relacionada à resistência contra patógenos necrotróficos e insetos mastigadores (Dodds & Rathjen, 2010; Glazebrook, 2005), por meio da produção de ROS. Porém, apesar das diferenças, diversos genes são compartilhados pelas duas rotas.

Outras respostas que derivam da detecção de motivos moleculares, ou efetores e ativação das vias de AS e AJ/ET, são as alterações de parede celular. A parede celular vegetal possui proteínas estruturais de três grandes classes

denominadas, HRGP (do inglês: hydroxy-proline rich proteins), PRP (do inglês: proline-rich proteins) e GRP (do inglês: glycine-rich proteins). Bradley e colaboradores em 1992 demonstraram que na presença de elicitores (motivos moleculares) provocam a rápida oxidação mediada por peróxidos de oxigênio de proteínas estruturais da parede, provocando ligações covalentes entre tais proteínas modificando as propriedades físicas da parede. Esta alteração, que se inicia 5 minutos após o contato com o elicitador de fungo, está finalizada 20-30 minutos após o primeiro sinal. Estes intercruzamentos alteram a solubilidade de tais proteínas (estruturas de 33 a 35Kd, para estruturas de 100Kd), o que pode dificultar a ação de enzimas secretadas por um organismo invasor. O mesmo trabalho demonstra que não somente a presença do elicitador, mas também um ferimento, provoca a mesma alteração na parede celular do modelo utilizado. Esta rápida alteração na parede, com a diminuição de sua solubilidade, é a primeira linha de defesa da planta aos estresses biótico e abióticos. Os trabalhos de Corbin e colaboradores em 1987, Sauer e colaboradores em 1990 e Sheng e colaboradores em 1991, demonstram a mudanças nas transcrições das proteínas HRPGs e PRPs em resposta a ferimentos e na presença de elicitores de fungos, sugerindo que a oxidação das proteínas no curto prazo é seguido da transcrição de genes que incrementam a capacidade da planta de continuar aumentando o número de intercruzamentos em sua parede celular.

A composição da parede celular vegetal pode ser alterada em decorrência de estímulos ambientais, bióticos e abióticos. Danos físicos, infecções e a presença de elicitores pode ocasionar a síntese de lignina em tecidos adjacentes ao foco de estresse. Além disso, elicitores causam a rápida interligação de proteínas estruturais presentes na parede celular mediadas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estas proteínas são as HRGP (do inglês: hydroxy-proline-rich glycoproteins), PRP (proline-rich proteins) e GRP (Bradley et al., 1992). É conferido a estas proteínas funções estruturais na arquitetura da parede. Em uma suspensão de células de soja, proteínas ricas em prolina de dois pesos moleculares denominada p33/p35, quando, tratadas com uma suspensão de elicitores de *Phytophthora megasperma*, são convertidas a uma proteína insolúvel de peso molecular superior denominada p100. Esta conversão se inicia em 5 minutos após o primeiro contato com os elicitores culminando com a conversão total em 20 minutos. Este

fenômeno consiste em uma rápida resposta ao estresse onde proteínas estruturais ricas em prolina existentes na parede celular são interligadas por uma reação oxidativa intermediada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tornando-se insolúveis. Este fenômeno é seguido pelo incremento na expressão de genes que codificam proteínas estruturais de parede celular, o que aumenta a capacidade de mais cross-links na parede.

## 1.2 RNAs não-codificantes

### 1.2.1 O que são pequenos RNAs não-codificantes?

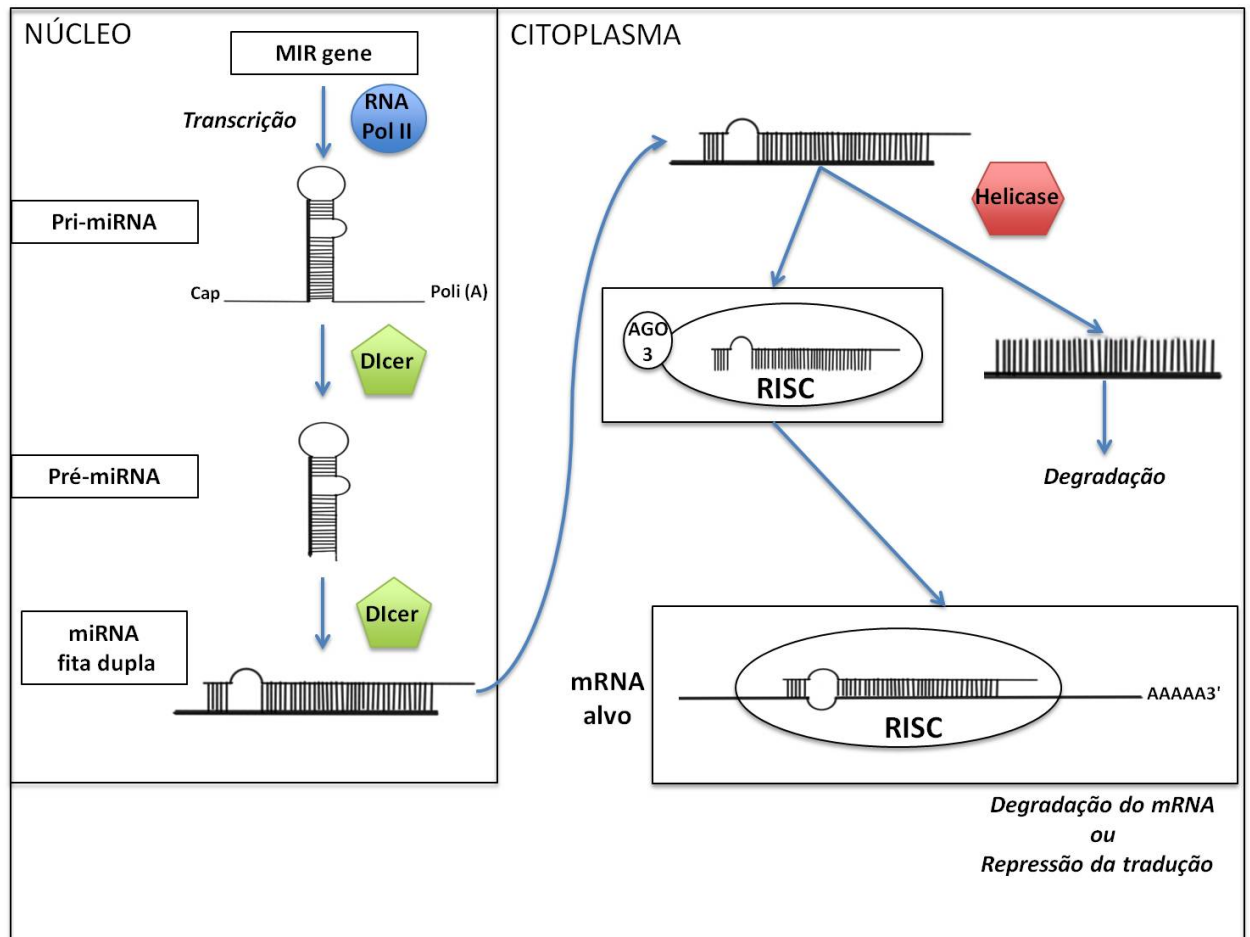
Pequenos RNAs não codificantes são moléculas de RNA, com aproximadamente 22 nucleotídeos, com funções regulatórias, sendo primeiramente descobertos no nematoide *Caenorhabditis elegans* por Lee & Ambros e Reinhart e colaboradores em 2000-2001. Os miRNAs são pequenos RNAs que consistem em um RNAs de fita simples (quando maduros), expressos endogenamente, e que regulam genes negativamente após sua transcrição (Bartel 2004).

Uma diferença importante entre miRNAs de animais e de plantas, é que o pareamento entre o RNA maduro e o RNA mensageiro alvo em plantas pode ser completo, o que determinaria o silenciamento daquele gene e não somente sua supressão (Bartel et al., 2004; Voinnet et al., 2005).

Conforme ilustrado pela Figura 5, a transcrição dos miRNAs ocorre dentro do núcleo e se dá pela ação da RNA polimerase II gerando transcritos primários, ou pri-miRNA (Bartel et al., 2004). Estes pri-miRNAs por sua vez são processados pela *Dicer* (DCR - RNASE III na Figura 5), resultando nos pré-miRNA, os quais foram um estrutura denominada *hairpin* (Waterhouse et al., 2003; Jung et al., 2006). Uma digestão também intermediada pela *Dicer*, digere as fitas duplas do pré-miRNA em miRNAs maduros, que são então exportados para o citoplasma (Bartel et al. 2004; Jung et al. 2006).

No citoplasma, os miRNAs maduros, de dupla fita, por ação de uma helicase são separados em duas fitas simples (miRNA maduro e miRNA\* - sua fita complementar), e então o miRNA maduro e de fita simples, é incorporado ao complexo ribonucleico do qual a proteína Argonauta (AGO) faz parte. Por sua

vez, este complexo, denominado complexo RISC (RNA Induced Silencing Complex) pode suprimir a expressão gênica ao catabolizar RNAs mensageiros codificantes para proteínas alvo da sequência do miRNA maduro (Bartel, 2004; Jung et al., 2006; Voinnet et al., 2005), constituindo no silenciamento ou supressão pós-transcricional da expressão gênica.



**Figura 5 - Representação esquemática das etapas envolvidas na transcrição, maturação e atividade dos miRNAs. Representação esquemática preparada pelo próprio autor.**

Em vegetais, os miRNAs são importantes reguladores do desenvolvimento vegetal, bem como regulam respostas a patógenos (Zhai et al, 2011; Li et al., 2012), formação de nódulos (Jung et al, 2006; De Carvalho, 2012), entre outros processos biológicos. Um fator importante na regulação intermediada por miRNAs em plantas é o de que geralmente as sequências do miRNA são complementares às do mRNA alvo, sendo assim, quando existe



complementaridade completa ao invés de supressão, o que ocorrerá será um completo silenciamento (Carrington & Ambros. 2003; Jones-Rhoades et al., 2006). Portanto, na prática, o mecanismo funciona regulando genes por silenciamento pós-transcricional.

Em fungos filamentosos (Kang et al., 2013; Lee et al., 2010; Zhou et al., 2012a; 2012b), também foram encontrados miRNAs, porém ainda pouco é sabido sobre suas funções e diversidade.

### **1.2.2 RNAs não-codificantes como efetores em processos infecciosos**

O corpo de evidências que sugere que os pequenos RNAs, miRNAs entre eles, se movimenta pela planta vêm crescendo. Em 1998, Jorgensen e colaboradores propuseram que a sinalização e transporte de moléculas ao longo do floema modulando a resposta a infecções virais poderia ser mediada por RNA. Ainda em 1998, Sasaki e colaboradores encontraram RNA mensageiros na seiva do arroz.

Em 2010, Chitwood e Timmermans em uma revisão acerca da movimentação de pequenos RNAs sedimentou conhecimento gerado até aquele momento, os quais sugeriam que moléculas de 21-24 nucleotídeos movimentavam-se célula a célula e através de vasos, e que estas moléculas significavam implicações sobre processos biológicos, variando de desenvolvimento vegetal, resposta à estresses e herança epigenética.

Na revisão de Marín-González & Suárez-Lopez 2012, apresenta-se a movimentação de miRNAs através do floema e movimento apoplástico, com efeitos descritos e preditos em diversas espécies de vegetais. Estão entre os fenômenos que os miRNAs regulam, ou são componentes da regulação, sincronização da floração, desenvolvimento de raízes laterais, resposta à seca, absorção ou homeostase de nutrientes entre outros. Entretanto, até o momento os mecanismos que regulam a movimentação de miRNAs, bem como os mecanismos de translocação destas moléculas não é ainda totalmente compreendido.

Uma vez que ao longo da evolução os miRNAs e outros pequenos RNAs surgiram como moléculas regulatórias com abrangência sistêmica, em alguns

casos, seria de se esperar que micro-organismos endofíticos que tenham co-evoluído com estes vegetais, possam apresentar soluções adaptativas que interfiram neste mecanismo, valendo-se de pequenos RNAs para estabelecer relações de simbiose ou predação.

Weiberg e colaboradores, em 2013, demonstraram que o fungo *Botrytis cinerea* produz pequenos RNAs de 20-21 nucleotídeos que possuem papel relevante no processo de estabelecimento de uma infecção em seu hospedeiro. Alguns destes pequenos RNAs tem sua expressão induzida em *Botrytis* na fase inicial do processo infeccioso em tomate, e também em *Arabidopsis*. Estes pequenos RNAs, por sua vez, possuem como alvos genes envolvidos com os mecanismos de defesa da planta dos hospedeiros, ou seja, possuem uma atividade interespecífica. Este artigo, e suas conclusões, são evidências centrais para as hipóteses sendo testadas nesta tese, e contribuem para o entendimento do papel dos pequenos RNAs na adaptabilidade de agentes infecciosos fúngicos.

Também Cai e colaboradores, em 2018, demonstraram que a *Arabidopsis* secreta vesículas extracelulares que contém pequenos RNAs no local de contato com o agente infeccioso *Botrytis cinerea*. Estes pequenos RNAs, ao serem incorporados pelo fungo, interferem na expressão de genes críticos para o processo infeccioso. A publicação conclui que a *Arabidopsis*, por meio da força de seleção, apresenta um mecanismo de excreção de pequenos RNAs como parte de sua corrida co-evolutiva com o patógeno.

### **1.3 Elementos de Transposição**

#### **1.3.1 O que são elementos de transposição?**

Elementos de transposição foram caracterizados primeiramente em plantas por Bárbara McClintock na década de 40. Os TE (do inglês transposable elements) são fragmentos de DNA que podem mudar de posição ao longo de um genoma, inserindo-se em novos sítios, ou ainda, sofrer duplicações. Apesar da descoberta de Barbara McClintock foi somente entre as décadas de 60 e 80 que os aspectos moleculares dos elementos passaram a ser estudados, em virtude da descoberta de elementos de transposição em bactérias, fungos e animais modelos.

Esses elementos estão presentes em grande número de cópias e são capazes de se amplificar e inserir aleatoriamente em diferentes posições no genoma hospedeiro, e podendo representar entre 50% e 90% do genoma de certas espécies vegetais (Flavell et al., 1994; Sanmiguel et al., 1996)

Castanera e colaboradores em 2016, ao analisar a presença de elementos de transposição em 18 genomas de fungos encontrou uma variedade extrema na presença de elementos na composição total dos genomas. A variação entre espécies de 0,02% (gênero *Pseudozyma*) a 29,8% (gêneros *Serpula* e *Puccinia*) do total do genoma consistindo de elementos.

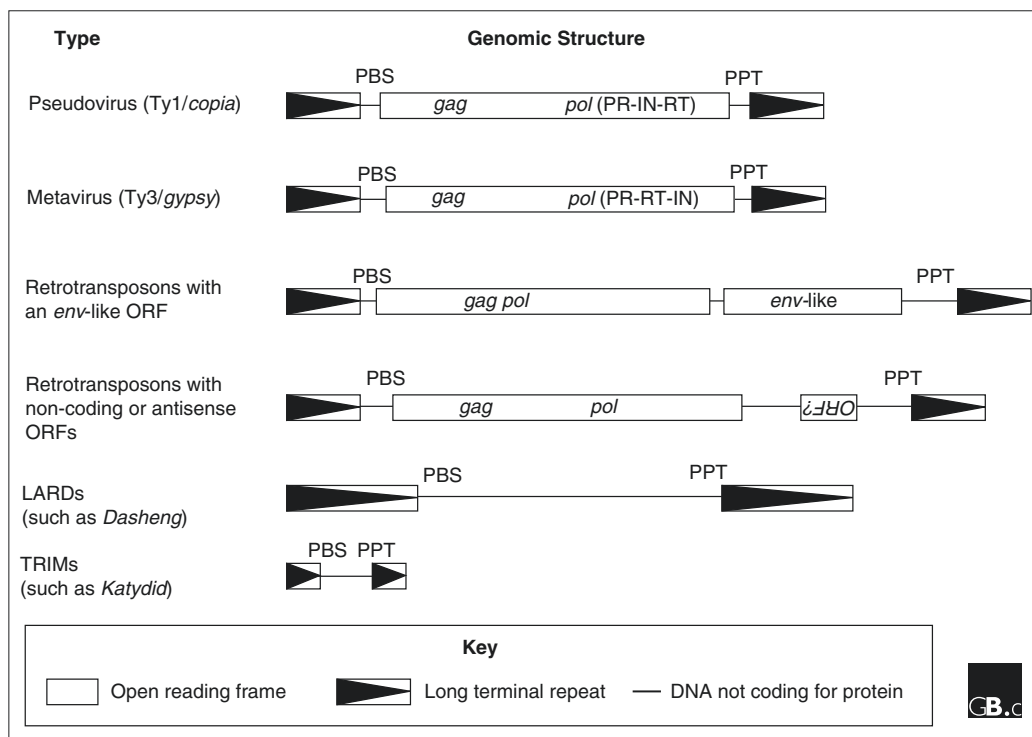
Os elementos são classificados de acordo com suas características e dividem-se em duas classes. Os retrotransposons são aqueles que necessitam de um intermediário de RNA para a transposição. Os elementos que não dependem de um RNA intermediário são os transposons clássicos de DNA.

### **1.3.2 Retrotransposons**

Os retrotransposons, por sua vez, podem ser subdivididos de acordo com a presença, ou ausência de Repetições Longas Terminais (do inglês LTR, “Long Terminal Repeats”). Elementos sem LTR estão divididos entre os LINE (Long Interspersed Nuclear Elements) e SINE (Short Interspersed Nuclear Elements). Já os elementos com LTR estão divididos entre Ty1/Copia e Ty3/Gypsy.

Os retrotransposons com LTR, tem características estruturais semelhantes aos retrovírus, apenas não possuindo uma sequência que codifique a proteína de envelope. Os retrotransposons com LTR são constituídos por domínios funcionais codificados por dois genes: gag e pol. O domínio gag é responsável por uma proteína semelhante ao capsídeo viral, que está envolvida na maturação e “empacotamento” do RNA e proteínas do retrotransposon a ser posteriormente integrado ao genoma. O gene pol (poliproteína) é responsável por codificar a transcriptase reversa, RNase H, e uma protease. As duas primeiras enzimas são necessárias para replicação e transposição, e a integrase permite que o retrotransposon já em forma de DNA possa inserir-se em uma nova região cromossômica. A protease é responsável pela maturação dos diferentes domínios citados da poliproteína.

O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (Havecker et al., 2004) sub-divide os retrotransposons com LTR em duas classes: Pseudoviridae e Metaviridae. Estas classes podem ser diferenciadas com base na ordem dos domínios protéicos de retrotransposons considerados arquétipos: os elementos Copia e Gypsy de *Drosophila*, respectivamente relacionados com os elementos Ty1 e Ty3 de levedura (Griffiths, 2001). Os elementos Ty3/Gypsy (Metaviridae) têm uma organização mais próxima a dos retrovírus e diferenciam-se do grupo Ty1/Copia (Pseudoviridae) por apresentar o domínio da transcriptase reversa anterior ao domínio da integrase. Ambos os grupos de retrotransposons com LTR são amplamente distribuídos no reino vegetal (Suoniemi et al., 1998; Voytas et al., 1992). A Figura 6 traz uma representação esquemática dos diferentes retrotransposons.



**Figura 6 - Organização genômica dos diferentes tipos de retrotransposons. PBS - sítio de ligação do *primer*; PPT - polipurina; PR - protease; RT - transcriptase reversa; TRIM - retrotransposons de terminais repetitivos em miniatura. Obtido em Havecker et al, 2004.**

Muszewska e colaboradores em 2011 prospectaram mais de 66.500 elementos nos 59 genomas estudados. Considerando a totalidade dos genomas,

apenas *Trichoderma atroviride* não apresentou nenhum retrotransposon. Todos os elementos encontrados pertenciam à superfamília dos Ty1/Copia ou Ty3/Gypsy, sendo que a maioria dos elementos encontrados em Ty3/Gypsy representam Chromoviridae. Há uma grande variedade na abundância de retrotransposons nos genomas, com alguns representantes com menos de 50 (*Ustilago maydis*) elementos e outros com mais de 8000 elementos (*Postia placenta*).

Já em 2013, Muszewska e colaboradores prospectaram os retrotransposons com tirosina-recombinase (YR). Os YR são divididos em três grupos: DIRS, Ngaro e VIPER. A análise de 42 genomas possibilitou o encontro de elementos ativos e remanescentes na ordem de 2200 elementos.

### **1.3.3 Retrotransposons e sua relação com pequenos RNAs não-codificantes**

Elementos de transposição são críticos para a evolução de genomas, estando associados a rearranjos que podem ser selecionados adaptativamente, sendo os retrotransposons com LTR difundidos nos eucariotos. Múltiplas cópias de genes e regiões reguladores, além de mutações e outras alterações na estrutura ou sequências de genes carregado pelos elementos de transposição, oferecem um grande portfólio de soluções adaptativas para hospedeiros, ou patógenos.

Regiões LTR são ricas em pequenos RNAs, apresentando funções regulatórias (Weiberg et al, 2015), com a provável função primária de manter a integridade do genoma. Além disso, pequenos RNAs são cruciais para regular a imunidade de plantas ao fazer o ajuste fino da expressão de genes (de Jong et al., 2011), mas também são cruciais para o *Botrytis cinerea* no que diz respeito à sua virulência e capacidade de infectar múltiplos hospedeiros (Weiberg & Jin., 2015). Uma classe de pequenos RNAs de cerca de 24 nucleotídeos foram mapeados nas regiões LTR de retrotransposons da família Gypsy em *Magnaporthe oryzae* que tem sua expressão incrementada durante o processo infeccioso do fungo (Raman et al., 2013).

Em publicação já mencionada, demonstrou-se que o fungo *Botrytis cinerea* produz pequenos RNAs de 20-21 nucleotídeos que estão codificados na

região LTR de retrotransposons (Weiberg et al., 2013). Alguns destes pequenos RNAs tem sua expressão induzida em *Botrytis* na fase inicial do processo infeccioso em tomate, e também em *Arabidopsis*. Estes pequenos RNAs, por sua vez, possuem como alvos genes envolvidos com os mecanismos de defesa da planta dos hospedeiros, ou seja, possuem uma atividade interespecífica.

Fahlgren e colaboradores, em 2013, valendo-se de ferramentas de bioinformática e sequenciamento de última geração, compararam o perfis de pequenos RNAs presentes em quatro protistas do gênero *Phytophthora*. Foram descobertas duas grandes classes de pequenos RNAs (21 ou menos nucleotídeos e 25/26 nucleotídeos), além de miRNAs. Além da distinção de tamanho, as duas classes de pequenos RNAs possuem origens diferentes, sendo aqueles de 21 ou menos bases oriundo de sequências invertidas e determinadas classes gênicas, e aqueles de 25/26 bases, associados a elementos de transposição. O grupo conclui que estas sequências associadas a elementos de transposição, possuem ação silenciadora de elementos moveis e outras regiões repetitivas, por meio de um mecanismo epigenético (ex. metilação). Por sua vez, este fenômeno seria crucial para a defesa do genoma e sua evolução, além de que a regulação epigenética de fatores de patogenicidade possuem impacto na virulência dos fungos e no leque de possíveis hospedeiros (Qutob et al., 2013).

## 4. Capítulo Primeiro

### 4.1 Introdução

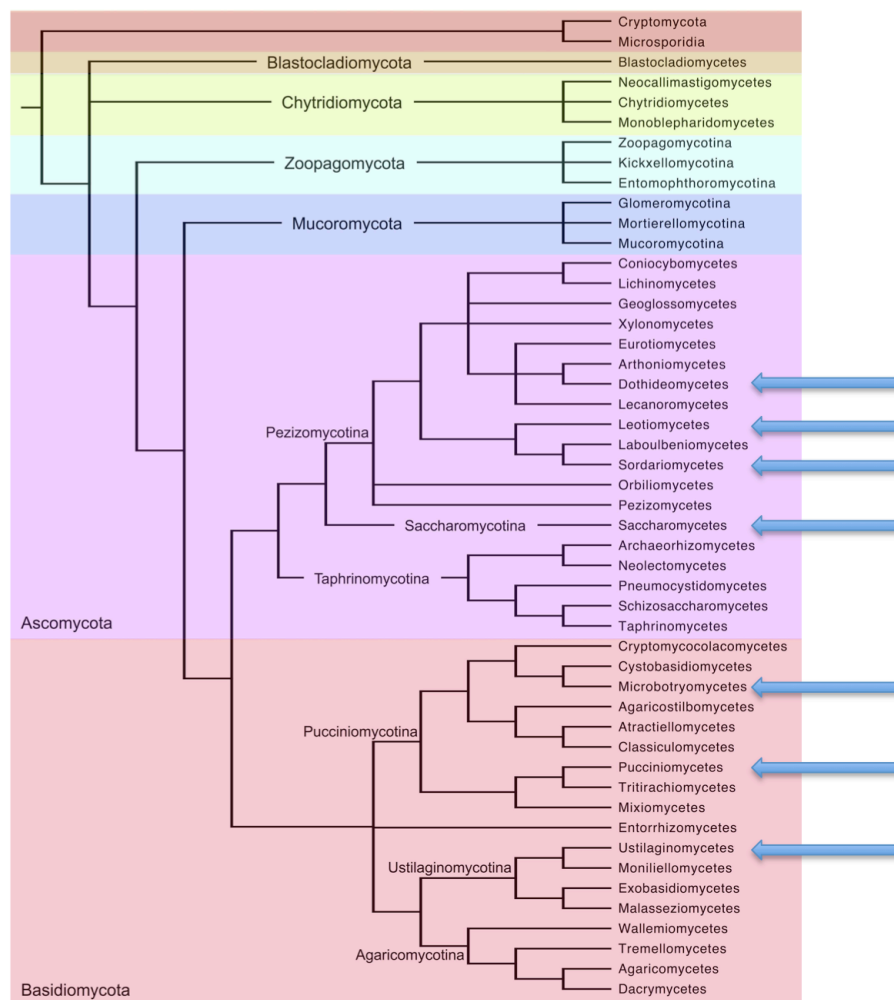
#### 4.1.1 Taxonomia de Fungos

Segundo Spatafora e colaboradores em 2017, as relações evolutivas no reino dos fungos é um dos desafios mais duradouros em sistemática e filogenética. Entretanto a filogenética molecular possibilitou um grande avanço no entendimento do Reino. Oito filos, doze subfilos e quarenta e seis classes estão definidos (Spatafora et al., 2017), representados na Figura 7. Os fungos considerados no presente trabalho pertencem aos filos Ascomycota e Basidiomycota, grupos pertencente ao sub-reino Dikaria. A escolha dos fungos analisados no presente trabalho envolveu aqueles que sabidamente possuem o impacto relevante na agricultura comercial. A distribuição dos fungos fitopatogênicos foi 5 DOTHIDIOMYCETES; 6 LEOTIOMYCETES; 7 SORDARYOMYCETES DO FILO ASCOMYCOTA (TOTAL 18 GENOMAS) E APENAS 5 GENOMAS DE BASIDIOMYCOTA (3 PUCCINIOMYCETES; 1 MYCOBOTRIOMYCETES E 1 USTILAGINOMYCETES).

O filo Ascomycota, divide-se em três subfilos: Taphrinomycotina, Saccharomycotina e Pezizomycotina. Este subfilo possui uma grande diversidade de fungos decompositores, espécies que apresentam relações antagonistas ou simbiotes com plantas e animais, além das leveduras. As leveduras estão contidas no subfilo Saccharomycotina, o qual possui uma única ordem: Saccharomycetales, onde incluem-se as espécies *Asbhya gossipii* e *Geotrichum candidum*. Já no subfilo Pezizomycotina estão contidas as espécies: *Macrophomina phaseolina*, *Leptosphaeria maculans*, *Phaeosphaeria nodorum*, *Pyrenophora tritici* e *Stemphylium lycopersici* (classe Dothideomycetes); *Blumeria graminis*, *Botrytis cinerea* e *Sclerotinia sclerotiorum* (classe Leotiomycetes); e *Colletotrichum graminicola*, *Colletotrichum higginsianum*, *Fusarium oxysporum*, *Gibberella zeae*, *Gaeumannomyces graminis var tritici*, *Thielaviopsis punctulata* e *Verticillium dahliae* (classe Sordariomycetes).

O filo Basidiomycota por sua vez, divide-se em três sub-filos: Pucciniomycotina, Ustilaginomycotina e Agaricomycotina. Este sub-filos contém

a maioria dos organismos simbiotes de plantas e decompositores de material vegetal. Estão contidos no sub-filo Pucciniomycota as espécies *Melampsora laricis*, *Puccinia graminis* e *Puccinia triticina* (classe Pucciniomycetes) e *Sporisorium reilianum* (classe Microbotryomycetes). Já no sub-filo Ustilaginomycotina encontra-se a espécie *Ustilago maydis* (classe Ustilaginomycetes).



**Figura 7 – Árvore filogenética dos fungos. Cladograma baseado em múltiplos genes e genomas completos. Cores indicam diferentes Filos e setas azuis indicam as classes pertencentes aos fungos estudados neste trabalho. Adaptado de Spatafora et al., 2017.**



#### 4.1.2 Argonautas (AGO) e Dicers (DCR) em fungos

Na introdução geral deste documento foi explanado o mecanismos de processamento de pequenos RNAs, em especial os miRNAs (Figura 5). Duas proteínas essenciais a este processamento são as AGO (argonautas) e as DCR (dicer). As DCR são membros da família de RNase III, as quais processam RNAs longos RNAs dupla fita em fragmentos de 21-26 nucleotídeos (Nakayashiki et al, 2006). Já as AGOs são proteínas que possuem dois domínios conservados (PAZ e PIWI). AGOs, são componentes essenciais do complexo de silenciamento de RNA RISC (RNA-induced silencing complex) (Nakayashiki et al, 2006).

As vias de processamento de pequenos RNAs em fungos podem apresentar diferenças. Alguns organismos como *Ustilago maydis* (Basidiomycota) e não possuem AGOs tampouco DRCs (Nakayashiki et al, 2006), assim como organismos como *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida lusitanae* (Ascomycota), não possuem qualquer elementos das vias de processamento de miRNAs (Moran et al., 2017; Nakayashiki et al, 2006).

Nakayashiki e colaboradores em 2006, considerando os genomas de fungos disponíveis na épocas, conduziram uma análise filogenética da presença de AGO, DCR e outras polimerases dependentes de RNA. Ascomicetos e Basidiomicetos, apresentaram possuíam alguns dos componentes do processamento de pequenos RNAs em seus genomas, enquanto alguns organismos não apresentaram quaisquer proteínas do maquinário, sugerindo uma grande diversidade de soluções evolutivas, sugerindo que a divergência de mecanismos de silenciamento de RNA ocorreu anteriormente às grandes diversificações nas linhagens dos fungos.

No mesmo artigo, Nakayashiki e colaboradores, em 2006, procederam uma análise filogenética com os ascomicetos *Aspergillus nidulans*, *Gibberella zeae*, *M. Oryzae*, *N. crassa*, *S. pombe*, e *Stagonospora nodorum*, além dos basidiomicetos *Coprinus cinereus*, *Cryptococcus neoformans* e *P. Chrysosporium* e o zigomiceto *Rhizopus oryzae*. Como grupos externos foram considerados *Arabidopsis thaliana* e *Drosophila melanogaster*. Os resultados demonstraram *Arabidopsis* e *Drosophila* agrupando-se separadamente, suportando a afirmação de que em fungos o processamento e silenciamento de pequenos RNAs pode ter evoluídos

de forma diversa. Importante mencionar que na publicação nenhum subfilo dos fungos formou grupos homogêneos. Os mecanismos, bem como funções das vias de silenciamento de pequenos RNAs em fungos permanece pouco desvendada. Poderia este maquinário possuir uma função não de regulação de seu próprio genoma, mas sim de regulação de genes no ambiente?

Duas categorias de pequenos RNAs, incluindo os miRNAs dependentes de DCR e os RNAs que interagem com Piwi (longos RNAs não-codificantes que interagem estruturalmente com proteínas) e independentes de DCRs estão ausentes em fungos (Lee et al., 2010). No mesmo estudo, Lee e colaboradores, em 2010, descobriram vias diversas de biogênese de pequenos RNAs no fungo *Neurospora crassa*. Algumas das vias, além da DCR, dependem de outras proteínas (QDE-2, QUIP e MRPLE3, respectivamente uma argonauta, uma exonuclease e uma RNase III). Outros processos são independentes de DCR.

## 4.5 Conclusão

O objetivo do conjunto de ensaios deste Capítulo constituiu em levantar a presença de genes que codificam para o maquinário de processamento de pequenos RNAs em 27 fungos estudados, especificamente AGO e DCR. Também buscamos entender se haviam relações entre as estratégias ecológicas e hospedeiros e as sequências encontradas, e por fim buscar evidências que indicassem que as sequências encontradas realmente são expressas pelos organismos estudados.

- Foi possível recuperar sequências com similaridade a AGO e DCR de 22 genomas de um total de 27 fungos. Conclui-se que os fungos, *Blumeria graminis* (e f sp *tritici*), *Botrytis cinerea* (linhagens b05\_10, bcDw1 e T4), *Colletotrichum graminicola*, *Colletotrichum higginsianum*, *Fusarium oxysporum* (Foc5176 e *lycopersici*), *Gaeumannomyces graminis var tritici*, *Gibberella zeae*, *Leptosphaeria maculans*, *Macrophomina phaseolina*, *Melampsora laricis*, *Phaeosphaeria nodorum*, *Puccinia graminis* (*hordeum* e UG99), *Puccinia triticina*, *Stemphylium lycopersici* , *Sclerotinia sclerotiorum*, *Thielaviopsis punctulata* e *Verticillium dahliae* podem utilizar o maquinário de processamento de pequenos RNAs.
- Foram encontrados de um a quatro genes AGO, e entre um a sete genes DCR. As árvores filogenéticas sustentam a existência de eventos de duplicação sem um padrão claro de diversificação quanto às estratégias ecológicas e de hospedeiros dos fungos fitopatogênicos.
- Apenas os genomas de *Ashbya gossypii*, *Geotrichum candidum*, *Pyrenophora tritici-repentis* e *Ustilago maydis* não apresentaram genes com similaridade a AGO e DCR. Conclui-se que estes fungos não utilizam o processamento de pequenos RNAs.
- O uso de dados públicos de RNA-seq produzidos para *Fusarium*, *Botrytis* e *Puccinia* demonstram que alguns dos genes parálogos que codificam para AGO e DCR são expressos nas condições testadas.

No caso do experimento realizado com *Puccinia* verificamos um aumento da expressão ao longo do estabelecimento da colonização pelo fungo biotrófico.

## 5. Capítulo Segundo

### 5.1 Introdução

#### 5.1.1 RNAs não-codificantes como efetores em fungos – Weiberg et al. 2013

Conforme citado anteriormente, em 2013, Weiberg e colaboradores demonstraram o papel de pequenos RNAs de do fungo *Botrytis cinerea* na regulação (supressão) de genes relacionados à resposta imune de *Arabidopsis thaliana*. Por meio do sequenciamento de uma biblioteca de pequenos RNAs preparada a partir de folhas de *Arabidopsis* e *Solanum lycopersicum* infectadas com o fungo *Botrytis cinerea* (linhagem B05.10), 832 sequências foram identificadas como presentes exclusivamente no genoma do fungo e não das plantas, ou seja, sequências de pequenos RNAs que foram sintetizadas pelo fungo e não pela planta e foram encontrados na biblioteca proveniente de amostras de folhas de *Solanum* e *Arabidopsis* infectadas com o fungo. Após executar um estudo de predição de alvos para estas 832 sequências de pequenos RNAs, Weiberg e colaboradores identificaram 73 sequências que possuíam como alvo genes sendo expressos pela planta. 52 sequências eram derivadas de 6 LTRs de retrotransposons.

Por fim, plantas de *Arabidopsis* foram transformadas com 3 destas sequências de pequenos RNAs e a planta passou a expressar os pequenos RNAs interferentes. Os alvo das sequências são os genes MPK2 e MPK1 (*Mitogen activated protein kinase*), PRXIIF (*peroxiredoxin*) e WAK (*cell wall-associated kinase*), proteínas relacionadas à defesa vegetal. O resultado deste experimento foram plantas com níveis incrementados de susceptibilidade à infecção de *Botrytis*, demonstrando a importância da expressão destes genes para o mecanismo de defesa vegetal e demonstrando o potencial dos pequenos RNAs, quando expressas pelo fungos invasor, em silenciar mecanismos de defesa do hospedeiro. Este artigo, e suas conclusões, são evidências centrais para as hipóteses sendo testadas nesta tese, e contribuem para o entendimento do papel dos retrotransposons e pequenos RNAs na adaptabilidade de agentes infecciosos fúngicos.

Em colaboração com o grupo de Weiberg, Wang e colaboradores em 2017 caracterizou outro conjunto de pequenos RNA de *Botrytis cinerea* quanto à sua propriedade em reduzir a expressão de genes relacionados à defesa em *Arabidopsis*. O efector Bc-siR37, produzido pelo fungo, possui 15 genes alvo em *Arabidopsis*, sendo estes genes relacionados à receptores de membrana, fatores de transcrição e enzimas capazes de modificar a parede celular. Assim como a publicação de Weiberg e colaboradores em 2013, *Arabidopsis* foram transformadas com o pequeno RNA Bc-siR37 de *Botrytis* demonstraram susceptibilidade aumentada à infecção do fungo, sugerindo que os alvos de supressão deste pequeno RNA são relacionados aos mecanismos de defesa da planta. Este consiste em mais um exemplo de pequenos RNA interespecífico atuando como efector no processo infeccioso de patógenos.

Não somente os agentes infecciosos interagem com seu hospedeiro, mas também há fluxo de pequenos RNAs no sentido oposto. Cai e colaboradores em 2018, demonstraram que a *Arabidopsis* secreta vesículas do tipo exossomo para entregar pequenos RNAs que se acumulam no local da infecção por *Botrytis cinerea*. Estes pequenos RNAs são então incorporados pelo fungo, que terminam por silenciar genes importantes para o processo de estabelecimento da infecção.

## 5.5 Conclusão

O objetivo do conjunto de ensaios do Capítulo Segundo consistiu em identificar a presença de sequências repetitivas nos genomas dos fungos e identificar dentre elas a presença de LTR-Retrotransposons. A partir destes, verificar computacionalmente a possível existência de pequenos RNAs localizados em retrotransposons identificados nos genomas dos fungos patogênicos que tenham algum alvo em sequências expressas de plantas.

- Foram recuperados aproximadamente 30 mil sequências correspondentes a sequências repetitivas, apresentando duas LTRs e contendo ao menos uma ORF foram identificadas nos 27 genomas estudados;

- Os 236 LTR-retrotransposons de *Phaeosphaeria*, *Ustilago*, *Puccinia*, *Sporisorium*, *Botrytis*, *Fusarium* resultaram por meio da busca de similaridade em 210 sequências distintas de 20-23 nucleotídeos, dos quais 109 *loci* associados à defesa;
- 32,6 % dos *loci* encontrados em *Arabidopsis* e *Oryza* para os fungos *Botrytis*, *Fusarium* e *Puccinia* são potencialmente associados à defesa;
- No fungo biotrófico *Puccinia* foi possível encontrar 49 (arroz) *loci* associados à defesa, enquanto foram encontrados valores numericamente menores para os fungos os necrotróficos *Botrytis* e *Fusarium*, com 11 e 21 (arabidopsis e arroz) e 8 (arabidopsis), respectivamente;
- O experimento controle partindo de sequências aleatórias respeitando a proporção G/C das sequências resultou em 21% de *loci* encontrados em *Arabidopsis* e *Oryza*. Os *loci* associados à defesa, bem como os termos GO encontrados, se mostraram específicos para cada conjunto analisado;
- O *loci* de inserção de alguns pequenos RNAs dentro dos LTR-retrotransposons é semelhante ao encontrado por Weiberg e colaboradores em 2013;
- A estratégia apresentada neste trabalho de utilizar retrotransposons como “semente” para a prospecção de pequenos RNAs produzidos por fungos patogênicos por análise de similaridade, pode ser uma estratégia viável, mas sua confirmação estatística carece de um universo amostral mais amplo.

## 6. Conclusão Geral

Este trabalho permite um conjunto de conclusões, porém, também traz à tona um grande conjunto de questões e novos caminhos a seguir no estudo de pequenos RNAs com função interespecífica. Estes caminhos poderão ser seguidos através de uma aplicação das ferramentas de bioinformática utilizadas, ou mesmo comprovação *in vivo* dos resultados aqui obtidos.

São as conclusões gerais do documento:

- Considerando os 27 fungos estudados, apenas *Ashbya gossypii*, *Geotrichum candidum*, *Pyrenophora tritici-repentis* e *Ustilago maydis*, não apresentaram genes que codificam para o maquinário processamento de pequenos RNAs através da estratégia utilizada. Os demais fungos apresentaram genes semelhantes a AGO e DCR;
- Em buscas por similaridade em bancos de dados de RNASeq em *Botrytis*, *Fusarium* e *Puccinia*, foi possível encontrar as sequências de AGO e DCR encontradas neste trabalho, sugerindo que as enzimas possam ser expressar *in vivo*;
- Não foi possível verificar para as sequências de DCR e AGO agrupamentos filogenéticos a partir das estratégias ecológica biotrófica, necrotrófica e hemibiotrófica e os hospedeiros de cada um dos fungos;
- Em *Puccinia*, dados de RNA-Seq sugerem a expressão de enzimas de processamento de pequenos RNAs ao longo do processo infeccioso, por exemplo, sendo detectados em haustórios do fungo. Também em *Puccinia*, uma maior proporção de *loci* associados à defesa pode ser encontrado por similaridade, partindo de LTR-retrotransposons deste fungo. Se comparado às sequências randômicas controle G/C 0.5, os 79 retrotransposons de *Puccinia*, analisados em conjuntos, resultaram em 49 *loci* associados à defesa, enquanto as 1000 sequências randômicas resultaram em 52 *loci*.
- A estratégia de prospecção de potenciais pequenos RNAs a partir de retrotransposons precisa ser melhor delineada. Entretanto, resultados obtidos para *Puccinia*, bem como a localização e inserção das sequências de 20-23 nucleotídeos encontradas em comparação com a literatura, são dados promissores.

## 7. Referências

Afzal A J, Wood A J, Lightfoot D A. Plant Receptor-Like Serine Threonine Kinases: Roles in Signaling and Plant Defense. 2008. MPMI Vol. 21, No. 5, 2008, pp. 507–517.

Ambawat S, Sharma P, Yadav N R, Yadav R C. 2013. MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. *Physiol Mol Biol Plants* 19(3):307–321

Ashburner et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet.* May 2000;25(1):25-9.

Bartel DP. 2004. MiRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 116(2):281-97.

Belkhadir Y, Subramaniam R.; Dangl J.L. 2004. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7, 391-399.

Bienert M D, Delannoy M, Navarre C, Boutry M. 2012. NtSCP1 from Tobacco Is an Extracellular Serine Carboxypeptidase III That Has an Impact on Cell Elongation. *Plant Physiology*, Vol. 158, pp. 1220–1229.

Blackwell M. 2011. The Fungi: 1, 2, 3...5.1 million species? *American Journal of Botany* 98(3):426-438.

Blanco-Ulate B, Morales-Cruz A, Amrine K C, Labavitch J M, Powell A L, Cantu D. 2014. Genome-wide transcriptional profiling of *Botrytis cinerea* genes targeting plant cell walls during infections of different hosts. *Front Plant Sci.* 2014 Sep 3;5:435.



Boyle P, Errol S, Rochon A, Shearer H L, Murmu J, Chu J Y, Fobert P R, Després C. 2009. The BTB/POZ Domain of the Arabidopsis Disease Resistance Protein NPR1 Interacts with the Repression Domain of TGA2 to Negate Its Function. *The Plant Cell*, Vol. 21: 3700–3713.

Bradley, D J; Kjellbom, P; Lamb, C J. 1992. Elicitor- and Wound-Induced Oxidative Cross-Linking of a Proline-Rich Plant Cell Wall Protein: A Novel, Rapid Defense Response. *Cell*, Vol. 70, 21-30.

Cai Q, Qiao L, Wang M, He B, Lin F, Palmquist J, Huang S, Jin H. 2018. Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science*. Jun 8;360(6393):1126-1129.

Carrington C J & Ambros V. 2003. Role of MicroRNAs in Plant and Animal Development. *Science (New York, N.Y.)*. 301. 336-8. 10.1126/science.1085242.

Castanera R, López-Varas L, Borgognone A, LaButti K, Lapidus A, Schmutz J, Grimwood J, Pérez G, Pisabarro G, Grigoriev I, Stajich J, Ramírez L. Transposable Elements versus the Fungal Genome: Impact on Whole-Genome Architecture and Transcriptional Profiles. *Plos Genetics*.

Chitwood D H & Timmermans M C P. 2010. Small RNAs are on the move. *Nature* 467:415-419.

Choi J, Kim K T, Jeon J, Wu J, Song H, Asiegbo F O, Lee Y H. 2014. funRNA: a fungi-centered genomics platform for genes encoding key components of RNAi. *BMC Genomics*. 15 Suppl 9:S14.

Corbin D R, Sauer N, Lamb C J. 1987. Differential regulation of a hydroxyproline-rich glycoprotein gene family in wounded and infected plants. *Mol. Cell. Biol.* 7, 4337-4344.

Dai X & Zhao P X. 2011. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Res.* Jul 1; 39: W155–W159.

De Carvalho, G A B. 2012. Análise transcricional dos genes envolvidos na nodulação e predição in silico de miRNAs em raízes de soja inoculadas com a estirpe CPAC 15 de *Bradyrhizobium japonicum*. Tese de Mestrados, Universidade Estadual de Londrina.

de Jonge R, Bolton, M D, Thomma, B P. 2011. How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 400–406.

Ellinghaus D, Stefan K, Ute W. 2008. "LTRharvest, an efficient and flexible software for de novo detection of LTR retrotransposons." *BMC bioinformatics* 9.1: 18.

EMBRAPA. 2006. Doenças na Cultura do Milho – Circular Técnica 83. ISSN 1679-1150.

Fahlgren N, Bollmann S R, Kasschau K D, Cuperus J T, Press CM. 2013. *Phytophthora* Have Distinct Endogenous Small RNA Populations That Include Short Interfering and microRNAs. *PLOS ONE* 8(10)

Flavell A J, Pearce S R, Kumar A. 1994. Plant transposable elements and the genome. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 4, n. 6, p. 838–844.

Gebrie S A. 2016. Biotrophic Fungi Infection and Plant Defense Mechanism. *J Plant Pathol Microbiol.* Volume 7, Issue 9, 1000378.

Giraldo M C, Valent B. 2013. Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 800–814.

Glazebrook J. 2005. CONTRASTING MECHANISMS OF DEFENSE AGAINST BIOTROPHIC AND NECROTROPHIC PATHOGENS. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:205–27 2005

Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. 2008. miRBase: tools for miRNA genomics. *NAR* 36:D154-D158

Griffiths, A J F. 2001. *Genética moderna*.

Havecker E, GAO X, VOYTAS D. 2004. The diversity of LTR retrotransposons. *Genome Biology*, v. 5, n. 6, p. 225.

Hemetsberger C, Herrberger C, Zechmann B, Hillmer M, Doehlemann G. 2012. The *Ustilago maydis* Effector Pep1 Suppresses Plant Immunity by Inhibition of Host Peroxidase Activity. *PLoS Pathog* 8(5): e1002684..

Huh S, Lee S-B, Kim H H, Paek K-H. 2012. ATAF2, a NAC Transcription Factor, Binds to the Promoter and Regulates NIT2 Gene Expression Involved in Auxin Biosynthesis. *Mol. Cells* 34, 305-313.

Jones J D G & Dangl J L. (2006). The Plant immune system. *Nature*. Vol 444 pg 323-329.

Jones-Rhoades M W, Bartel D P, Bartel B. 2006. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol.*;57:19-53.

Jorgensen R A, Atkinson R G, Forster R L S, Lucas W J. 1998. An RNA-Based Information Superhighway in Plants. *Science* 279: 1486-1487.

Jung J, Van Orden A. 2006. A three-state mechanism for DNA hairpin folding characterized by multiparameter fluorescence fluctuation spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 1240-9.

Kang K, Zhong J, Jiang L, Liu G, Gou C Y. 2013. Identification of microRNA-Like RNAs in the Filamentous Fungus *Trichoderma reesei* by Solexa Sequencing. *PLOS ONE* 8(10).

Kirk P M; Cannon P F; Minter D W; Stalpers J A. 2008. Dictionary of the Fungi. 10th Edition. CAB International, Wallingford, UK.

Knogge W. 1996. Fungal infection of plants. *The Plant Cell* 8:1711-1722.

Kurepa J, Walker J M, Smalle J, Gosink M M, Davis S J, Durham T L, Sung D-Y, Vierstra R D. 2003. The Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) Protein Modification System in Arabidopsis ACCUMULATION OF SUMO1 AND -2 CONJUGATES IS INCREASED BY STRESS. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 278, No. 9, Issue of February 28, pp. 6862–6872.

Langlois-Meurinne M, Gachon C MM, Saindrenan P. 2005. Pathogen-Responsive Expression of Glycosyltransferase Genes UGT73B3 and UGT73B5 Is Necessary for Resistance to *Pseudomonas syringae* pv tomato in Arabidopsis. *Plant Physiology*, Vol. 139, pp. 1890–1901.

Lapin D & Van den Ackerveken G. 2013. Susceptibility to plant disease: more than a failure of host immunity. *Trends in Plant Science*, Vol. 18, No. 10.

Lee H-C, Li L, Gu W, Xue Z, Crosthwaite K S, Pertsemlidis A, Lewis Z A, Freitag M, Selker E, Mello C, Liu Y. 2010. Diverse pathways generate microRNA-like RNAs and Dicer- independent small interfering RNAs in fungi. *Mol Cell*. June 25; 38(6): 803–814.

Lee R C & Ambros V. 2001. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294:862-864.

Li F, Pignatta D, Bendix C, Brunkard J O, Cohn M M, Tung J, Sun H, Kumar P, Baker B. 2012. MiRNA regulation of plant innate immune receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci* 109:1790-1795.

Li S. The Arabidopsis thaliana TCP transcription factors: A broadening horizon beyond development. *Plant Signaling & Behavior* 10:7.

- Liu J-Z, Li F, Liu Y. 2017. Plant Immunity against Viruses. *Front. Microbiol.* 8:520.
- Liu J, Rice JH, Chen N, Baum TJ, Hewezi T. 2014. Synchronization of Developmental Processes and Defense Signaling by Growth Regulating Transcription Factors. *PLoS ONE* 9(5): e98477.
- Mangeon A, Junqueira R M, Sachetto-Martins G. 2010. Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. *Plant Signaling & Behavior*, 5:2, 99-104.
- Marín-González E, Suárez-López P. 2012. And yet it moves": cell-to-cell and long-distance signaling by plant microRNAs. *Plant Sci. Nov*;196:18-30.
- Mendgen K & Hahn M. 2002. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends Plant Sci.* 2002 Aug;7(8):352-6.
- Meyers B C, Axtell M J, Bartel B, Bartel D P, Baulcombe D, Bowman J L, Cao X, Carrington J C, Chen X, Green P J, Griffiths-Jones S, Jacobsen S E, Mallory A C, Martienssen R A, Poethig R S, Qi Y, Vaucheret H, Voinnet O, Watanabe Y, Weigel D, Zhu J-K. 2008. Criteria for Annotation of Plant MicroRNAs. *The Plant Cell*, Vol. 20: 3186–3190.
- Morales A M A P, Borem A, Graham M A, Abdelnoor R V. 2012. Avanços dos estudos moleculares da interação da soja – ferrugem asiática. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 12 (1): 1-7.
- Moran Y, Agron M, Praher D, Technau U. 2017. The evolutionary origin of plant and animal microRNAs. *Nat Ecol Evol.* ; 1: .
- Moreau S, Thomson R M, Kaiser B N, Trevaskis B, Guerinot M L, Udvardi M K, Puppo A, Day A A. GmZIP1 Encodes a Symbiosis-specific Zinc Transporter in Soybean. 2002. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 277, No. 7, Issue of February 15, pp. 4738–4746.

Mourier T & Willerslev E. 2009. Retrotransposons and non-protein coding RNAs, Briefings in Functional Genomics, Volume 8, Issue 6, Pages 493–501

Muszevska A, Hoffman-Sommer M, Grynberg M. 2011. LTR Retrotransposons in Fungi. PLoS One 6.12 (2011): e29425.

Muszevska A, Steczkiewicz K, Ginalski K. 2013. DIRS and Ngaro Retrotransposons in Fungi. Plos One. Volume 8, Issue 9.

Nakayashiki H, Kadotani N, Mayama S. 2006. Evolution and Diversification of RNA Silencing Proteins in Fungi.. Journal of Molecular Evolution. Volume 63, Issue 1, pp 127–135.

Ownley B H, Trigiano R N. 2017. Third Edition. Plant Pathology: Concepts and Laboratory Exercises. CRC Press.

P, Rathjen. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. 2010. Nature Reviews Genetics volume 11, pages 539–548.

Palusa S G, Ali G S, Reddy A S N. 2007. Alternative splicing of pre-mRNAs of Arabidopsis serine/ arginine-rich proteins: regulation by hormones and stresses. The Plant Journal 49, 1091–1107.

Park C-J & Seo Y-S. 2015. Heat Shock Proteins: A Review of the Molecular Chaperones for Plant Immunity. Plant Pathol. J. 31(4) : 323-333.

Polverari A, Molesini B, Pezzotti M, Buonauro R, Marte M, Delledonne M. 2003. Nitric Oxide-Mediated Transcriptional Changes in Arabidopsis thaliana. MPMI Vol. 16, No. 12, pp. 1094–1105.

Puranik S, Sahu P P, Srivastava P S, Prasad M. 2012. NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. Trends in Plant Science, Vol. 17, No. 6.

Qin S, Ji C, Li Y, Wang Z. 2017. Comparative Transcriptomic Analysis of Race 1 and Race 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Induced with Different Carbon Sources. *G3* (Bethesda). Jul 5;7(7):2125-2138.

Quinlan A R & Hall I M. 2010. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*, Volume 26, Issue 6, 15, Pages 841–842,

Qutob D, Chapman P, Gijzen M. 2013. Transgenerational gene silencing causes gain of virulence in a plant pathogen. *Nature Communications* 4, Article 1349.

Raman V, Simon S, Romag A, Demirci F, Mathioni S, Zhai J, Meyers B, Donofrio N. 2013. Physiological stressors and invasive plant infections alter the small RNA transcriptome of the rice Blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *BMC Genomics*. 14:326.

Ranty B, Aldon D, Galaud J-P. 2006. Plant Calmodulins and Calmodulin-Related Proteins. *Plant Signaling & Behavior* 1:3, 96-104.

Reinhart, B J, Slack, F J, Basson M, Bettinger JC, Pasquinelli A E, Rougvie A E, Horvitz H R, Ruvkum G. 2000. The 21 nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403: 901-906.

Sanmiguel P. 1996. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science*, v. 274, n. 5288, p. 765–768.

Santos Silva M, Arraesa F B M, Campo M A, Grossi-de-Sad M, Fernandez D, Cândido E S, Cardoso M H, Francoe O L, Grossi-de-Saa M F. 2018. Review: Potential biotechnological assets related to plant immunity modulation applicable in engineering disease-resistant crops. *Plant Science*; 270 , pgs 72-84

Sasaki T, Chino N, Hayashi H, Fijuwara T. 1998. Detection of several mRNA species in rice phloem sap. *Plant Cell Physiol*. 39:895–897.

Sauer N, Corbin D R, Keller B., Lamb C J. 1990. Cloning and characterization of a wound-specific hydroxyproline-rich glycoprotein in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Cell Env.* 73, 257-266.

Selin C, Kievit T, Belmonte M, Dilantha Fernando W G. 2016. Elucidating the Role of Effectors in Plant-Fungal Interactions: Progress and Challenges. *Front. Microbiol.* 7:600.

Sharma B, Joshi D, Yadav PK, Gupta AK and Bhatt TK. 2016. Role of Ubiquitin-Mediated Degradation System in Plant Biology. *Front. Plant Sci.* 7:806.

Sheng J, D'Arcy R, Mehdy M C. 1991. Negative and positive regulation of a novel proline-rich protein mRNA by fungal elicitor and wounding. *Plant J.* 3, 345-354.

Shia Z, Maximov S, Liu Y, Verica J, Guiltinan M J. 2013. The Salicylic Acid Receptor NPR3 Is a Negative Regulator of the Transcriptional Defense Response during Early Flower Development in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*; Volume 6; Number 3; Pgs 802–816.

Smit A F A & R. Hubley. 2008. "RepeatModeler Open-1.0." Available from <http://www.repeatmasker.org>.

Smit A F A, Hubley R, Green P. RepeatMasker at <http://repeatmasker.org>

Spatafora J W, Aime M C, Grigoriev I V, Martin F, Stajich J E, Blackwell M. 2017. The Fungal Tree of Life: from Molecular Systematics to Genome-Scale Phylogenies. *Microbiol Spectr.* Sep;5(5).

Stanke M, Steinkamp R, Waack S, Morgenstern B. 2004. "AUGUSTUS: a web server for gene finding in eukaryotes" *Nucleic Acids Research*, Vol. 32, W309-W312



Stergiopoulos I, de Wit, P J. 2009. Fungal effector proteins. *Ann. Rev. Phytopathol.* 47, 233–263.

Suoniemi A, Tanskanen J, Schulman A H. 1998. Gypsy-like retrotransposons are widespread in the plant kingdom. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, v. 13, n. 5, p. 699–705.

Tremblay A, Hosseini P, Li S, Alkharouf N W, Matthews B F. 2013. Analysis of *Phakopsora pachyrhizi* transcript abundance in critical pathways at four time-points during infection of a susceptible soybean cultivar using deep sequencing. *BMC Genomics* 2013, 14:614

Upadhyaya N M, Garnica D P, Karaoglu H, Sperschneider J, Nemri A, Xu B, Mago R, Cuomo C A, Rathjen J P, Park R F, Ellis J G, Dodds P N. 2015. Comparative genomics of Australian isolates of the wheat stem rust pathogen *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* reveals extensive polymorphism in candidate effector genes. *Front Plant Sci.* Jan 8;5:759.

Van der Biezen E A & Jones J D G. 1998. Plant disease- resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Plant Sci.* 23: 454–456.

van der Hoorn R A L & Kamoun S. 2008. From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell*, 20:2009-2017.

Voinnet O. 2005. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nature Rev. Genet.* 6, 206–220.

von Saint Paul V, Zhang W, Kanawati B, Geist B, Faus-Keßler T, Schmitt-Kopplin P, Schüffner A. 2011. The Arabidopsis Glucosyltransferase UGT76B1 Conjugates Isoleucic Acid and Modulates Plant Defense and Senescence. *The Plant Cell*, Vol. 23: 4124–4145.

Voytas D F. 1992. Copia-Like Retrotransposons Are Ubiquitous Among Plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 89, n. 15, p. 7124–7128.

Wang M, Weiberg A, Dellota E, Yamane D, Jin H. 2017. Botrytis small RNA Bc-siR37 suppresses plant defense genes by cross-kingdom RNAi. RNA Biol. 2017; 14(4): 421–428.

Wang X, Goregaoker S P, Culver J N. 2009. Interaction of the Tobacco Mosaic Virus Replicase Protein with a NAC Domain Transcription Factor Is Associated with the Suppression of Systemic Host Defenses. JOURNAL OF VIROLOGY, pgs. 9720–9730

Watanabe N & Lam E. 2006. Arabidopsis Bax inhibitor-1 functions as an attenuator of biotic and abiotic types of cell death. The Plant Journal 45, 884–894

Waterhouse P M, Helliwell C A. 2003. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. Nat Rev Genet; 4(1):29-38.

Weiberg A, Jin H. 2015. Small RNAs — the secret agents in the plant–pathogen interactions. Current Opinion in Plant Biology Volume 26, Pages 87–94

Weiberg A, Wang M, Bellinger M, Jin H. 2014. Small RNAs: A New Paradigm in Plant-Microbe Interactions. Annu Rev Phytopathol. 52:495-516

Weiberg A, Wang M, Lin F, Zhao M, Zhang H, Z Kaloshian I, Jin H 2013. Fungal Small RNAs Suppress Plant Immunity by Hijacking Host RNA Interference Pathways. Science, 342(6154), 118–123.

Wit, PJ. 2002. Plant Biology: on guard. Nature 416 1:289-302.

Wojtasik W, Kulma A, Boba A, Szopa J. 2014. Oligonucleotide treatment causes flax  $\beta$ -glucanase up-regulation via changes in gene-body methylation. *BMC Plant Biology*, 14:261

Wojtasik W, Kulma A, Dymińska L, Hanuza J, Czemplik M, Szopa J. 2016. Evaluation of the significance of cell wall polymers in flax infected with a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*. *BMC Plant Biology*, 16:75.

Xiaohong Zhuang and Liwen Jiang. SH Domain Proteins in Plants: Roles in Signaling Transduction and Membrane Trafficking. *Livro: SH Domains. Structure, mechanisms & applications*; Springer Elsevier; pp 17-13.

Zhai J, Jeong D H, De Paoli E, Park S, Rosen B D, Li Y, González A J, Yan Z, Kitto S L, Grusak M A, Jackson S A, Stacey G, Cook D R, Green P J, Sherrier D J, Meyers B C. 2011. miRNAs as master regulators of plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs. *Genes Dev.* 25(23):2540-2553.

Zhang L, Du L, Poovaiah B L. 2013. Calcium signaling and biotic defense responses in plants. *Plant Signaling & Behavior* 9:11, e973818.

Zhao X & Wang H. 2007. "LTR\_FINDER: an efficient tool for the prediction of full-length LTR retrotransposons." *Nucleic acids research*35.suppl\_2: W265-W268.

Zhou B, Mural R V, Chen X, Oates M E, Connor R A, Martin G B, Gough J, Zeng L. 2017. A Subset of Ubiquitin-Conjugating Enzymes Is Essential for Plant Immunity. *Plant Physiology*, Vol. 173, pp. 1371–1390.

Zhou J, Fu Y, Xie J, Li B, Jiang D et al. 2012a. Identification of miRNA-like RNAs in a plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* by high-throughput sequencing. *Mol Genet Genomics* 287:275-282. V 44, 256-283.

Zhou Q, Wang Z, Zhang J, Meng H, Huang B. 2012b. Genome-wide identification and profiling of miRNA-like RNAs from *Metarhizium anisopliae* during development. *Fungal Biol.* 116:1156-1162.