



Universidade de Brasília  
Instituto de Biologia  
Departamento de Biologia Celular  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**CARACTERIZAÇÃO de microRNAs NA INTERAÇÃO *Musa acuminata*-*Pseudocercospora musae***

**ERICA CRISTINA SILVA REGO**

**BRASÍLIA - DF  
FEVEREIRO - 2023**

**ERICA CRISTINA SILVA REGO**

**CARACTERIZAÇÃO de microRNAs NA INTERAÇÃO *Musa acuminata*-*Pseudocercospora musae***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) da Universidade de Brasília como requisito parcial para à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Molecular).

**Orientador:** Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller, PhD

**Coorientadora:** Dra. Priscila Grynberg, PhD

**BRASÍLIA - DF  
FEVEREIRO - 2023**

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

REGO, Erica Cristina Silva

**CARACTERIZAÇÃO DE microRNAs NA INTERAÇÃO *Musa acuminata-Pseudocercospora musae***/Erica Cristina Silva Rego

Brasília, 2023. p. 177

Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), Universidade de Brasília, Brasília.

I. *P. musae-Musa acuminata* spp.

II. Universidade de Brasília. PPG/BIOMOL

III. **CARACTERIZAÇÃO DE microRNAs NA INTERAÇÃO *Musa acuminata-Pseudocercospora musae***

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pois só ele me deu forças para continuar e finalizar meu doutorado. Agradeço a todos os órgãos de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Instituto nacional de Ciência e Tecnologia (INCT), Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) pelos recursos financeiros disponibilizados ao longo da minha trajetória acadêmica. Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) (PPG-BIOMOL), pela oportunidade de realização do meu doutorado.

Agradeço de todo o coração o meu professor e orientador Dr. Robert Neil Gerard Miller, saiba que eu sou extremamente grata pela sua orientação, sua paciência, confiança e apoio durante todo o meu mestrado e doutorado. A toda equipe de Bioinformática da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (EMBRAPA Cenargen), principalmente a minha coorientadora Dra. Priscila Grynberg, que foi um anjo com toda a sua paciência e dedicação as minhas análises de sequenciamento e dos miRNAs, meu sincero muito obrigada!

A todos os meus colegas de trabalho Gabriel, Fernando, Michelle, Guilherme, Lucas, Erica Castro, Guilherme e em especial a Pós-doc mais dedicada de todos os tempos Taísa, meu muitíssimo obrigada pela sua dedicação, seu apoio, sua ajuda no meu trabalho e pelos conselhos lá na escada rrsrs.

E por fim, a todos que contribuíram de alguma forma para a execução desta pesquisa.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Dr. Robert Neil Gerard Miller, com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT), Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (EMBRAPA Cenargen).

## **CARACTERIZAÇÃO DE microRNAs NA INTERAÇÃO** *Musa acuminata-Pseudocercospora musae*

**Erica Cristina Silva Rego**

TESE APROVADA em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ por:

---

Dr. Robert Neil Gerard Miller  
Orientador

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) UnB

---

Dra. Marília de Castro Rodrigues Pappas  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Embrapa/Cenargen

---

Dra. Lucília Helena Marcellino  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Embrapa/Cenargen

---

Dra. Eliane Ferreira Noronha  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) - UnB

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL .....	xi
ABSTRACT .....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	15
2.1 Aspectos botânicos e taxonomia do gênero <i>Musa</i> .....	15
2.2 Importância econômica e aspectos agronômicos .....	16
2.3 Problemas fitossanitários .....	18
2.4 Sigatoka-amarela .....	19
2.5 Sintomatologia da Sigatoka-amarela .....	22
2.6 Controle de Sigatoka-amarela .....	24
2.7 Melhoramento genético em <i>Musa</i> .....	25
2.8 Imunidade vegetal desencadeada por padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) .....	26
2.9 Imunidade vegetal desencadeada por efetores - ETI .....	27
2.10 RNAs não codificantes (ncRNA).....	29
2.10.1 microRNAs .....	30
2.10.2 Biogênese dos miRNAs .....	31
2.10.3 miRNAs em plantas.....	33
3. JUSTIFICATIVA .....	35
4. OBJETIVOS.....	36
4.1 Objetivo Geral.....	36
4.2 Objetivos Específicos.....	36
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
5.1 Coleção de isolados de <i>P. musae</i> , identificação, crescimento e manutenção.....	37
5.2 Extração de DNA genômico de <i>P. musae</i> .....	38
5.3 Identificação molecular de <i>P. musae</i> .....	38
5.4 Preparo do inóculo para o bioensaio .....	39
5.5 Bioensaio para sequenciamento de pequenos RNAs de <i>Musa acuminata</i> - <i>P. musae</i> 40	
5.6 Extração e purificação do RNA total de <i>M. acuminata</i> .....	42
5.7 Sequenciamento de pequenos RNAs em plataforma Illumina .....	42
5.8 Análise das sequências de pequenos RNAs .....	43
5.9 Identificação de miRNAs de <i>Musa</i> .....	43
5.10 Análise <i>in silico</i> da expressão diferencial de miRNAs .....	44

5.11	Predição de potenciais alvos do miRNAs .....	44
5.12	Análise de ontologia gênica (GO) dos alvos preditos .....	45
5.13	Síntese de cDNA do miRNAs .....	45
5.14	Síntese de cDNA para os genes alvos de <i>Musa</i> .....	46
5.15	Validação da expressão dos miRNAs e dos genes alvos de <i>Musa</i> via RT-qPCR	46
6.	RESULTADOS .....	48
6.1	Identificação molecular de <i>P. musae</i> .....	48
6.2	Extração e purificação do RNA total para o sequenciamento dos miRNAs .....	49
6.3	Predição de miRNAs em <i>M. acuminata</i> var. Calcutta 4 .....	51
6.3.1	Análise do sequenciamento de sRNAs .....	51
6.3.2	Identificação de miRNAs em <i>M. acuminata</i> .....	52
6.3.3	Análise <i>in silico</i> de expressão diferencial de miRNAs de <i>M. acuminata</i> em resposta a <i>P. musae</i> .....	55
6.3.4	<i>Heatmap</i> dos genes de miRNAs diferencialmente expressos e seus genes alvos em <i>M. acuminata</i> var. Calcutta 4 aos 3 e 12 dias após inoculação com <i>P. musae</i> .....	56
6.3.5	Predição dos genes-alvos e dos novos miRNAs identificados em <i>Musa acuminata</i> var. Calcutta 4 .....	59
6.3.6	Análise ontologia gênica (GO) de genes-alvo de miRNAs .....	59
6.3.7	Validação da expressão relativa via RT-qPCR dos miRNAs de <i>M. acuminata</i> e dos seus genes alvos .....	61
7.	DISCUSSÃO .....	64
8.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	73
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	74
10.	ANEXO I – MATERIAL SUPLEMENTAR .....	83
	ANEXO II – PRODUÇÃO INTELECTUAL .....	129
	ARTIGO JÁ PUBLICADO .....	129

## Índice de Figuras

- Figura 1.** Produção em toneladas dos principais países produtores de banana do mundo. Adaptado de *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), 2021..... 17
- Figura 2.** Ciclo de vida de *P. musae*, agente causal da Sigatoka-amarela da bananeira. Adaptado de AGRIOS, 2005..... 21
- Figura 3.** Evolução das lesões na face adaxial foliar em *M. acuminata* causadas pela Sigatoka-amarela, cujo agente patogênico é *P. musae*, observadas em microscópio estereoscópio (CORDEIRO; MATOS; FILHO, 2004). ..... 23
- Figura 4.** Sintomas da Sigatoka-amarela causados por *P. musae*: estádios iniciais da doença (A); manchas elípticas (B); necrose foliar (C); perdas na produção (D). Fonte: Boletim Embrapa. .... 24
- Figura 5.** Modelo “zigzague” do sistema imune em plantas (JONES e DANGL, 2006). Na primeira fase, as plantas detectam os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs, diamantes vermelhos), desencadeando uma resposta de imunidade (PTI). Na segunda fase, patógenos entregam com sucesso efetores que interferem na PTI, ativando a susceptibilidade desencadeada por efetores (ETS). Na terceira fase, um efector (indicado na figura em vermelho, Avr) é reconhecido pelas proteínas NB-LRR, ativando a imunidade desencadeada por efetores (ETI), uma versão ampliada de PTI que muitas vezes induz a resposta de hipersensibilidade (HR). Na quarta fase, novos efetores podem surgir através do fluxo horizontal de genes (em azul), ajudando os patógenos a suprimir a ETI. A seleção por parte das plantas de novos alelos de proteínas NB-LRR, que podem reconhecer um dos efetores recém adquiridos, dispara novamente a ETI..... 29
- Figura 6.** Diferentes grupos de RNAs não codificantes (ncRNAs estruturais e ncRNAs regulatórios) e seus respectivos subgrupos. Imagem adaptada de BHOGIREDDY et al. (2021). ..... 30
- Figura 7.** Modelo da biogênese e mecanismos de ação de miRNAs em plantas. Adaptado de DJAMI-TCHATCHOU e colaboradores (2017)..... 33
- Figura 8.** Isolamento direto de *Pseudocercospora musae* a partir de lesões de Sigatoka-amarela em folhas de bananeira. A e B- Lesão adaxial; C- Esporodóquios (contendo os conídios); D- Fungo crescido em meio de cultura V8. .... 37
- Figura 9.** Resumo das etapas envolvidas na multiplicação de *P. musae* para produção de inóculo (A- F). Preparação de um macerado a partir de colônias do fungo (A e B); Adição de água e maceração (C e D); Aplicação do macerado sobre o meio V8 e o espalhamento com alça de Drigalski (E e F) (Pinheiro et al., 2022)..... 40
- Figura 10.** A- Inoculação na face abaxial da folha de bananeira com *P. musae*. B- Distribuição aleatória das bananeiras no fitotron. .... 41
- Figura 11.** Eletroforese do produto da amplificação da região ITS do rDNA dos seis isolados de *P. musae* coletados na Estação Experimental de Biologia – UnB, em gel de agarose a 1%.

MM - Marcador Molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen); 1 – 018b BA; 2 - 01EB; 3 - 12EB; 4 - 15EB; 5 - 55EB; 6 - 90EB..... 48

**Figura 12.** Resultado da extração final de RNA foliar para o sequenciamento dos miRNAs, em gel de agarose a 1%. O RNA total foi extraído de folhas de *M. acuminata* subsp. *burmanicoides* var. Calcutta 4 não infectadas e artificialmente desafiadas com conidiósporos do isolado 15EB de *P. musae*. Identificação das amostras conforme tabela 4. \*Amostras não utilizadas para sequenciamento. MM = 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen)..... 51

**Figura 13.** Visualização da estrutura secundária de 4 novos miRNAs que foram identificados em *M. acuminata* var. Calcutta 4. As estruturas secundárias dos miRNAs foram determinadas utilizando o *software* Forna (<http://rna.tbi.univie.ac.at/forna/>). As sequências destacadas em verde representam as sequências star, em azul as sequências do miRNA maduro e em cinza a sequência de uma possível sequência star (N15). ..... 53

**Figura 14.** Distribuição dos tamanhos e abundância dos pequenos RNAs de *M. acuminata* var. Calcutta 4. Barras em azuis: 3DAI; Barras em vermelho 12DAI; barras escuras: amostras não inoculadas e barras claras: amostras inoculadas..... 53

**Figura 15.** Famílias de miRNAs e respectivo número de membros em *M. acuminata* var. Calcutta 4, observadas na biblioteca de pequenos RNAs caracterizados entre os quatro tratamentos experimentais..... 54

**Figura 16.** Diagrama de Venn mostrando os números de miRNAs identificados em *M. acuminata* var. Calcutta 4, observados nas quatro bibliotecas de sRNA. DAI = dias após inoculação; I= inoculado; NI= não inoculado..... 55

**Figura 17.** *Heatmap* dos genes diferencialmente expressos dos miRNAs e seus genes alvos em *Musa acuminata* var. Calcutta 4 aos 3 e 12 dias após inoculação com *P. musae*. As comparações foram avaliadas a partir dos valores de *Log2Fold Change* de cada tratamento. Os valores originais de expressão para os miRNAs e genes-alvo foram normalizados com EdgeR. Expressão gênica positiva foram representadas em vermelho, e expressão gênica negativa foram representadas em azul. Abreviação: DAI, dias após a inoculação. .... 59

**Figura 18.** Distribuição dos termos de GO enriquecidos, nas três categorias principais, para os genes diferencialmente expressos em *M. acuminata* após a interação com *P. musae* ..... 60

**Figura 19.** Gel de agarose 4 % para visualização dos amplicons, originados via RT-PCR de tamanho esperado para os miRNAs de *Musa*. 1: miR171a-3p\_I; 2: miR171a-3p\_NI; 3: miR164c-5p\_I; 4: miR164c-5p\_NI; 5: mi171e-3p\_I; 6: mi171e-3p\_NI; 7: miR393b-3p\_I; 8: miR393b-3p\_NI; 9: miR397a-5p\_I; 10: miR397a-5p\_NI; 11: miR167a-3p\_I; 12: miR167a-3p\_NI; 13: miR167b-3p\_I; 14: miR167b-3p\_NI; 15: miR167a-5p\_I; 16: miR167a-5p\_NI; 17: miR535d-5p\_I; 18: miR535d-5p\_NI. 19: Marcador Molecular 100bp *DNA ladder* (Promega). ..... 61

**Figura 20.** Níveis de expressão relativa via RT-qPCR dos miRNAs selecionados e dos seus genes alvos em *M. acuminata* var. Calcutta 4. Os erros padrão foram calculados com base nos dados após a análise de três réplicas biológicas por tratamento e três réplicas técnicas de amplificação através da RT-qPCR. As análises estatísticas foram realizadas por teste de ANOVA. .... 63

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Produção brasileira de banana por estado em 2021.....	18
<b>Tabela 2.</b> Sequências dos <i>primers</i> utilizados na amplificação do DNA para a identificação molecular de <i>P. musae</i> e o tamanho esperado do <i>amplicon</i> .....	39
<b>Tabela 3.</b> Delineamento experimental para os bioensaios <i>M. acuminata</i> - <i>P. musae</i> . A tabela mostra o número de plantas utilizada em cada condição. ....	42
<b>Tabela 4.</b> Delineamento das amostras selecionadas para sequenciamento de pequenos RNAs de <i>M. acuminata</i> ssp. <i>burmannica</i> Calcutta 4, após interação com <i>P. musae</i> . ....	43
<b>Tabela 5.</b> Sequência dos <i>stem loop primers</i> usados na síntese de cDNA dos miRNAs e sequência dos primers específicos para quantificação relativa de cada miRNA. ....	47
<b>Tabela 6.</b> Sequência dos <i>primers</i> dos miRNAs em <i>Musa</i> . ....	47
<b>Tabela 7.</b> Análises das sequências por similaridade via <i>BLASTN</i> no Genbank, para as três regiões genômicas analisadas. ....	49
<b>Tabela 8.</b> Quantificação do RNA total extraído de folhas de <i>M. acuminata</i> var. Calcutta 4 inoculadas com <i>P. musae</i> e controle não inoculado, em espectrofotômetro <i>NanoDrop</i> ® <i>Lite</i> ((ND-1000 UV-Vis - Thermo Scientific, EUA).....	50
<b>Tabela 9.</b> Dados resultantes do sequenciamento de sRNA extraído de folhas de <i>M. acuminata</i> var. Calcutta 4 desafiadas ou não com <i>P. musae</i> , via Illumina Hiseq 2500. ....	52

## RESUMO GERAL

MicroRNAs endógenos (miRNAs) são pequenos RNAs não codificantes que regulam a expressão gênica no nível pós-transcricional por clivagem ou repressão da tradução do mRNA. MicroRNAs em plantas regulam diversos processos celulares, incluindo respostas de defesa a estresses bióticos. A bananeira (*Musa* spp.), uma cultura monocotiledônea cultivada em regiões tropicais, é suscetível a inúmeras doenças devido à esterilidade e a um estreito *background* genético. *Pseudocercospora musae*, agente causal da Sigatoka-amarela, é um importante fungo patogênico da bananeira, causando perdas devido à redução da área foliar funcional. Até o momento, o papel dos miRNAs no patossistema *Musa-P. musae* não foi investigado. Neste estudo, amostras de RNA foliar foram extraídas de *Musa acuminata* subsp. *burmannicoides*, var. Calcutta 4 (resistente), aos 3 e 12 dias após a inoculação (DAI) com conidiósporos do patógeno. Após a construção de uma biblioteca de pequenos RNAs, as amostras foram sequenciadas usando a tecnologia *Illumina HiSeq 2500*. Sequências de alta qualidade foram mapeadas contra o genoma de referência de *M. acuminata* ssp. *malaccensis* var. Pahang e os miRNAs de *Musa* foram preditos usando os programas Mireap e ShortStack. Um total de 202 miRNAs conservados, previamente conhecidos, pertencentes a 30 famílias de miR foram identificados, juntamente com 24 novos miRNAs preditos. Os membros de miRNA conservados incluem aqueles das famílias miRNA156, miRNA166, miRNA171, miRNA396, miRNA167, miRNA172, miRNA160, miRNA164, miRNA168, miRNA159, miRNA169, miRNA393, miRNA535, miRNA482, miRNA2118 e miRNA397, todos conhecidos por estarem envolvidos na resposta de imunidade vegetal. Os potenciais genes alvos dos miRNAs de *Musa* foram preditos usando o programa TargetFinder, com transcrição gênica dos alvos em *Musa* regulados positivamente ou negativamente pelos miRNAs durante a infecção. A análise de enriquecimento de ontologia gênica (GO), indicou termos de atividade molecular potencialmente relacionados a respostas de defesa que incluem: ligação ao ácido nucleico, ligação de nucleotídeo, atividade de oxidoreductase e atividade de proteína quinase. Os termos do processo biológico associados à defesa incluem: resposta a hormônio, redução da oxidação e resposta ao estresse oxidativo. Ligação ao DNA, a atividade do fator de transcrição, e a regulação da transcrição, indicam o envolvimento de genes-alvo de miRNA de *Musa* na regulação da expressão gênica do hospedeiro durante as respostas de defesa a *P. musae*. Os miRNAs altamente abundantes, caracterizados durante a interação do hospedeiro com o patógeno e nos controles, identificados com base nos dados de expressão sRNA-seq, incluíram um total de 147 em 3DAI e 151 em 12DAI. Em 3DAI, oito miRNAs de diferentes famílias foram diferencialmente expressos entre amostras inoculadas e controle, com base em dados de sRNA. Em 12DAI, apenas um único miRNA foi diferencialmente expresso entre as amostras inoculadas e controle. Os dados de expressão de sRNA-seq, para miRNAs selecionados, e os dados de RNAseq para seus genes alvo em *Musa*, durante a interação do patógeno hospedeiro, também foram validados, via *stem-loop* RT-qPCR e RT-PCR convencional. Os dados de 11 miRNA, selecionados com base na abundância da família e envolvimento conhecido nas respostas de defesa da planta, revelaram modulação variável e uma frequente correlação inversa de expressão entre miRNAs e genes alvos. A caracterização de miRNAs em *M. acuminata* subsp. *burmannicoides*, var. Calcutta 4, e a análise do seu papel na modulação da expressão gênica do gene alvo durante a interação com *P. musae*, fornecem novas informações sobre respostas de defesa mediadas por miRNA na planta, aplicáveis em engenharia genética para controle da doença de Sigatoka-amarela.

**Palavras chave:** *Musa acuminata*, *Pseudocercospora musae*, Sigatoka-amarela, estresse abiótico, microRNAs, *stem-loop* quantitativo PCR em tempo real

## ABSTRACT

Endogenous microRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that regulate gene expression at the post-transcriptional level by cleavage or repression of mRNA translation. MicroRNAs in plants regulate diverse cellular processes, including defense responses to biotic stresses. Banana (*Musa* spp.), a monocotyledonous crop cultivated throughout tropical regions, is susceptible to numerous diseases due to sterility and a narrow genetic background. *Pseudocercospora musae*, the causal agent of Sigatoka leaf spot disease, is an important fungal pathogen of banana, causing losses due to a reduction in functional leaf area. To date, the role of miRNAs in the *Musa-P. musae* pathosystem has not been investigated. In this study, leaf RNA samples were extracted from *Musa acuminata* subsp. *burmannicoides*, var. Calcutta 4 (resistant), at 3 and 12 days after inoculation (DAI) with pathogen conidiospores. Following small RNA library construction, samples were sequenced using Illumina HiSeq 2500 technology. High quality sequences were mapped against the *M. acuminata* ssp. *malaccensis* var. Pahang reference genome and plant miRNAs were predicted using the programs Mireap and ShortStack. A total of 202 conserved miRNAs previously known to belong to 30 miR-families were identified, together with 24 novel miRNAs. Conserved miRNA members include those from families miRNA156, miRNA166, miRNA171, miRNA396, miRNA167, miRNA172, miRNA160, miRNA164, miRNA168, miRNA159, miRNA169, miRNA393, miRNA535, miRNA482, miRNA2118 and miRNA397, all of which are known to be involved in plant immune responses. The potential host gene targets of *Musa* miRNAs were predicted using TargetFinder, with gene transcripts in the plant host targeted by up- and down-regulated microRNAs during infection. Gene ontology (GO) enrichment analysis indicated molecular activity terms potentially related to defense responses that included nucleic acid binding, nucleotide binding, oxidoreductase activity and protein kinase activity. Biological process terms associated with defence included response to hormone, oxidation-reduction and response to oxidative stress. DNA binding, transcription factor activity, regulation of transcription and nucleus also indicate the involvement of numerous *Musa* miRNA target genes in regulation of host gene expression during the defence responses to *P. musae*. Highly abundant miRNAs characterized during the host interaction with the pathogen and in controls, identified on the basis of sRNA-seq expression data, included a total of 147 at 3DAI and 151 at 12DAI. At 3DAI, eight miRNAs from different miR-families were significantly differentially expressed between inoculated and control samples on the basis of sRNA data. At 12DAI, only a single miRNA was significantly differentially expressed between inoculated and control samples. sRNA-seq expression data for selected miRNAs and RNAseq data for their target *Musa* genes during the host pathogen interaction was also validated using stem-loop quantitative real-time PCR (qRT-PCR). For a total of 11 miRNA family members selected on the basis of family abundance and known involvement in plant defence responses, data revealed varying modulation and a frequent negative correlation of expression between miRNAs and target host genes. The characterization of miRNAs in resistant *M. acuminata* subsp. *burmannicoides*, var. Calcutta 4 and examination of their role in target gene expression modulation during interaction with *P. musae* provides novel information on miRNA-mediated defence responses in the plant, applicable in genetic engineering for control of Sigatoka leaf spot disease.

**Keywords:** *Musa acuminata*, *Pseudocercospora musae*, Sigatoka leaf spot, biotic stress, microRNAs, Illumina, stem-loop quantitative real-time PCR.

## 1. INTRODUÇÃO

A bananeira (*Musa* spp.) é uma das principais fontes de alimento do mundo. A banana é uma das frutas mais consumidas na maioria dos países tropicais e subtropicais, sendo componente básico da alimentação de mais de 400 milhões de pessoas (BOONRUANGROD; FLUCH; BURG, 2009). Segundo a organização *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 2020), o Brasil é um dos principais produtores, ficando atrás apenas da Índia, China e Filipinas. As cultivares comerciais produzem frutos partenocárpicos (sem sementes), o que contribui para a redução de variabilidade genética, resultando em lavouras com pouca resistência a pragas e doenças (DASH; RAI, 2016).

Segundo a FAO, estima-se que até 2050 a demanda por alimentos, fibras e combustíveis dobrará, levando a comunidade científica a enfrentar desafios para aumentar a produtividade agrícola. Entre os principais fatores ligados às perdas de produção, os mais importantes são os patógenos que acarretam doenças agrícolas, que causam perdas de quase 5% do PIB mundial (cerca de US \$ 1,4 trilhões) (DONATELLI et al., 2017).

Uma grande variedade de patógenos causam doenças na cultura da bananeira, dentre os agentes estão os vírus, bactérias, nematoides e fungos (BHAKTA; TAK; GANAPATHI, 2020). Os fungos se destacam como um dos principais causadores de perdas na produção da banana por ocasionarem doenças como a Sigatoka-amarela, Sigatoka-negra, e Mal do Panamá (DRENTH; KEMA, 2021). Dentre essas doenças podemos destacar a Sigatoka-amarela causada pelo fungo *Pseudocercospora musae* (Zimm.) Deighton, se destaca como um dos principais causadores de doenças fúngicas da bananeira (KIMUNYE et al., 2020). *P. musae* é um patógeno hemibiotrófico, e a sua infecção ocorre por meio dos estômatos. Os principais sintomas dessa doença são, o surgimento de estrias e lesões na face adaxial das folhas, diminuição do tamanho dos cachos e amadurecimento prematuro dos frutos (CALOU et al., 2020). Atualmente, uma das principais formas de controle da Sigatoka-amarela tem sido feita com a utilização de agroquímicos à base de cobre (KUMAKECH et al., 2022), porém seu uso aumenta o custo da produção e, em excesso, contribui para a seleção de linhagens resistentes, além de causar impacto negativo sobre o meio ambiente e a saúde humana (MILLER et al., 2008). O desenvolvimento de variedades de bananeira resistentes à doenças têm sido uma abordagem promissora e sustentável. Neste contexto, é importante compreender os mecanismos moleculares chave que regulam a resposta imunológica durante a interação *Musa-P. musae*.

MicroRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA não codificantes de 20–24 nucleotídeos (nt) de comprimento que são codificadas por genes miRNA e podem regular

processos biológicos complexos em plantas. Os miRNAs agem em nível pós-transcricional silenciando genes alvos em plantas e animais (SONG et al., 2019). Esses atuam através da degradação ou repressão da tradução de moléculas alvos de RNA mensageiro (mRNA) (BARTEL, 2004). Os miRNAs de plantas regulam diversos processos biológicos e fisiológicos por meio da interação com seus mRNAs alvo. Isso inclui vias reguladoras que controlam o desenvolvimento, reprodução, metabolismo, transdução de sinal e a resposta das plantas a estresses bióticos e abióticos (AKDOGAN et al., 2016; INAL et al., 2014; KULCHESKI et al., 2011; NUNES et al., 2011).

Diversos estudos já relataram que os miRNAs são importantes para respostas imunes de plantas contra vírus, bactérias, oomicetos e fungos (FEI et al., 2016; SEO et al., 2013; STAIGER et al., 2013), modulando a expressão de genes alvo associados com a imunidade desencadeada por PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) ou PTI (*pathogen-triggered immunity*), ou genes associados com a imunidade desencadeada por efetores de patógenos, chamada de ETI (*effector-triggered immunity*). Em relação às respostas imunes das plantas, numerosos miRNAs foram identificados em diferentes patossistemas, por exemplo, no tomate durante a interação com *Phytophthora infestans* (LUAN; CUI; ZHAI, 2015), em *Triticum aestivum* durante interações com o patógeno *Puccinia triticina* (DUTTA et al., 2019), em *Camellia sinensis* durante a infecção por *Colletotrichum gloeosporioides* (JEYARAJ et al., 2019), em arroz durante interação com *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (WANG et al., 2004) e em *Arabidopsis* durante a interação com *Phytophthora capsica* (ZHU et al., 2020). O envolvimento significativo de miRNAs de plantas em ramos específicos do sistema imune inato também foi identificado. Esses incluem, por exemplo, miRNAs como miR393, que suprime a sinalização de auxina e contribui para a imunidade desencadeada por PAMPs (PTI) (NAVARRO et al., 2006), assim como o miR482 e miR5300, que demonstraram regular a expressão do gene NLR (*nucleotide-binding leucine-rich repeat receptors*) em respostas imunes desencadeadas por efetores (ETI) nas *Solanaceae* (JIANG et al., 2018; OUYANG et al., 2014; SHIVAPRASAD et al., 2012).

Em *Musa*, até o presente momento, poucos estudos foram realizados sobre os miRNAs presentes no genoma. No entanto, os dados apresentados, com base nas abordagens de predição do genoma, indicam que um total de 266 miRNAs em 47 famílias foram preditos no genoma A (*Musa acuminata* Colla) (D'HONT et al., 2012), com 270 membros em 42 famílias preditas no genoma B (*M. balbisiana* Colla) (DAVEY et al., 2013). Os miRNAs também foram caracterizados em *Musa* sob diferentes estresses de temperatura (LIU et al., 2018; VIDYA; RAVISHANKAR; LAXMAN, 2018; ZHU et al., 2019) e em amostras de RNA total para

cultivares contrastantes em resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (SONG et al., 2016). Estudos caracterizaram os padrões de expressão do miR169 em *Musa* após a infecção por *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raça tropical 4 (SONG et al., 2018). Estudos realizados por Fei et al (2019) também relataram mais de 110 miRNAs maduros durante a interação do tecido da raiz da bananeira Cavendish com *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raça tropical 4.

Neste contexto, este estudo teve como objetivo identificar, caracterizar e validar os miRNAs potencialmente envolvidos na defesa de *M. acuminata* var. Calcutta 4 (resistente) durante a interação com *P. musae*. Os miRNAs identificados por meio do sequenciamento de pequenos RNAs, junto com os potenciais genes alvos, foram validados em relação a expressão via PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). A partir desse trabalho será possível contribuir com novos conhecimentos sobre os miRNAs que participam direta e indiretamente nos mecanismos de defesa da planta frente à infecção por *P. musae*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos botânicos e taxonomia do gênero *Musa*

A bananeira (*Musa* spp.) é uma planta monocotiledônea, perene e herbácea, cuja parte aérea é eliminada após a colheita. Apresenta um caule subterrâneo denominado rizoma, e é a partir do rizoma que são emitidas as raízes primárias, possui um sistema radicular fasciculado (forma de cabeleira) que pode atingir até 5 metros de comprimento, sendo mais comum de 1 a 2 metros, dependendo da condição edafoclimática e da variedade (SIMMONDS; SHEPHERD, 1955). A bananeira é pertencente à classe Liliopsida, subclasse Zingiberidae, superordem Liliales, ordem Zingiberales, família Musaceae (CHEESMAN, 1947). Segundo Simmonds & Shepherd (1955), *M. acuminata* Colla e *M. balbisiana* Colla são duas espécies selvagens das quais se originaram quase todas as bananas comestíveis. Na evolução das bananeiras comestíveis, todas as cultivares existentes são oriundas de hibridações, principalmente de duas espécies diplóides selvagens, *M. acuminata* Colla (genoma A  $2n=2x=22$ ) e *M. balbisiana* Colla (genoma B,  $2n=2x=22$ ) (SILVA et al., 2013). Cruzamentos resultaram em uma série de diplóides, triplóides e tetraplóides, com grupos genômicos classificados como AA, AB, AAA, AAB, ABB, AABB, AAAB e ABBB (SIMMONDS; SHEPHERD, 1955).

A família Musaceae é dividida em três subfamílias: Heliconoideae, Strelitzoideae e Musoideae. Os gêneros *Ensete* e *Musa* pertencem à subfamília Musoideae. Existe uma classificação proposta por Cheesman (1947), que dividiu o gênero *Musa* com base no número de cromossomos e características morfológicas, dividindo-o em dois grupos: espécies com

n=10 cromossomos (seções Australimusa e Callimusa) e espécies com n=11 cromossomos (seções Rhodochlamys e (Eu-) *Musa*). As duas últimas seções (n=11) possuem espécies com germoplasma de grande potencial para o melhoramento genético de variedades cultivadas. De acordo com Shepherd (1990), essas espécies são da seção Rhodochlamys, *M. laterita* Cheesman, *M. ornata* Roxburgh, *M. rubra*, *M. velutina* Wendl e Drude. E da seção (Eu-) *Musa*: *M. acuminata* Colla, *M. balbisiana* Colla, *M. flaviflora* Simmonds, *M. halabanensis* Meijer, *M. ochracea* Shepherd e *M. schizocarpa* Simmonds.

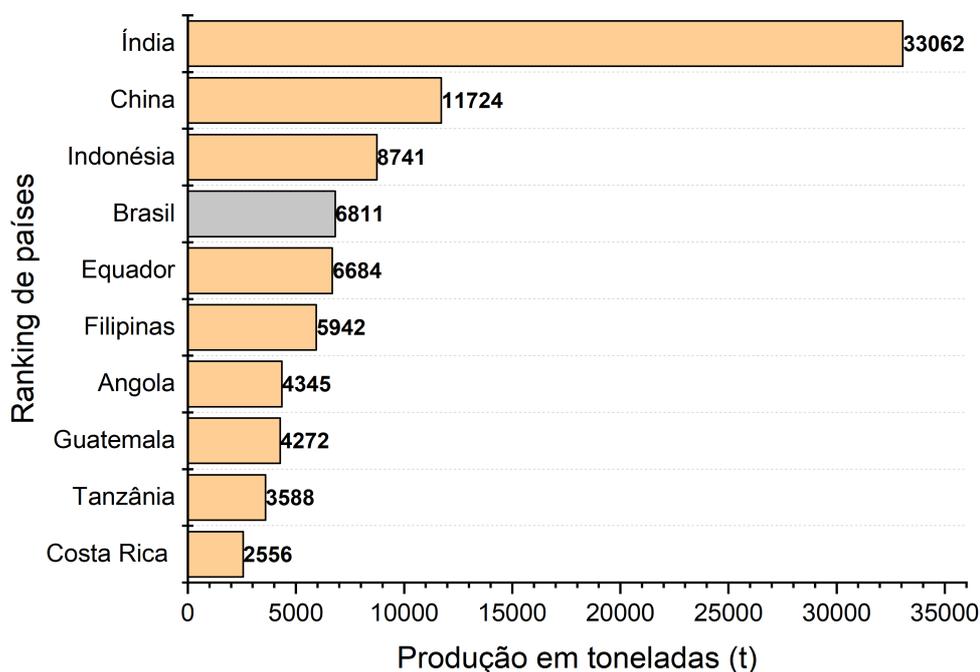
## 2.2 Importância econômica e aspectos agronômicos

O centro de origem da banana (*Musa* spp.) é o sudeste asiático e o oeste do Pacífico. A fruta é uma das principais fontes de alimento para milhões de pessoas no mundo (BOONRUANGROD; FLUCH; BURG, 2009). Na África, mais de 70 milhões de pessoas obtêm 25% da sua dieta proveniente de banana (FUNGO; PILLAY, 2011). As bananas são consumidas de várias formas, incluindo cruas, cozidas, assadas, cozidas no vapor ou fermentadas (NANSAMBA et al., 2020). A banana é cultivada em vários países, principalmente nas regiões tropicais quentes e úmidas do mundo com chuvas abundantes, incluindo África, América Latina, Caribe, Ásia e Pacífico (NANSAMBA et al., 2020). De longe, as cultivares mais importantes pertencem ao grupo triploide AAA de *M. acuminata*, comumente referido como bananas do grupo Cavendish, elas representaram a maioria das exportações de banana, e o abastecimento durante todo o ano os torna críticos para a segurança alimentar global (ZHU et al., 2019).

Em todo o mundo, são reconhecidas mais de mil cultivares de banana ou variedades terrestres (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2007). Apenas cerca de 10 a 15% das bananas são cultivadas para exportação, com o restante servindo como uma cultura de subsistência importante em muitos países em desenvolvimento (NOAR; DAUB, 2016). A banana também é um importante commodity de exportação multibilionária para consumo principalmente em países desenvolvidos, onde poucos cultivares de banana são cultivados (CHURCHILL, 2011). De acordo com a organização *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), a banana ocupa a primeira posição na produção mundial de frutas, com aproximadamente 125 milhões de toneladas produzidos, e uma área de plantio estimada em cinco milhões de hectares em 2021. A exportação mundial da fruta atingiu a marca de 20,5 milhões de toneladas em 2021 (FAO, 2021).

O Brasil é o quarto maior produtor de banana do mundo, ficando atrás apenas da Índia, China e Indonésia (FAO, 2021) (Figura 1). A produção brasileira é de cerca de 7 mil toneladas,

com uma área plantada de aproximadamente 453 mil hectares (FAO, 2021).



**Figura 1.** Produção em toneladas dos principais países produtores de banana do mundo. Adaptado de *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) Disponível em <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QI>> Acesso em: janeiro 2023.

A maior produção brasileira de banana ocorre em São Paulo, seguida por Bahia, Minas Gerais, Santa Catarina e Pernambuco (Tabela 1) (EMBRAPA, 2021). Embora o Brasil tenha contribuição de 6% na produção mundial de banana, o país é responsável por apenas 1% das exportações mundiais do produto. A produção brasileira de bananas é quase que totalmente dirigida ao mercado interno, fator decorrente do elevado número populacional brasileiro e ao grande consumo per capita nacional (EMBRAPA, 2019).

Existem quatro subgrupos principais de variedades de bananeira: Prata, Maçã, Cavendish e Terra, os quais contam com um ou mais cultivares, sendo que os mais difundidos no Brasil são: ‘Prata’, ‘Pacovan’, ‘Prata Anã’, ‘Maçã’, ‘Mysore’, ‘Terra’ e ‘DAngola’, do grupo AAB, e ‘Nanica’, ‘Nanicão’ e ‘Grande Naine’ do grupo AAA (BORGES; SOUZA, 2004; CORDEIRO; MATOS; HADDAD, 2016). As cultivares mais utilizadas para cultivo são: banana Prata, Pacovan, Maçã, Grande Naine e Terra. As cultivares de banana Maçã e banana da Terra são suscetíveis à Sigatoka-amarela, enquanto que as cultivares Prata, Pacovan e Grande Naine são suscetíveis à Sigatoka-negra e a Sigatoka-amarela. Com relação ao mal-do-

Panamá, a 'Grande Naine' e a 'Terra' são resistentes, a 'Maçã' é altamente suscetível e as demais cultivares são medianamente suscetíveis (SILVA et al., 2013).

As doenças são as principais causas de perdas no rendimento e na qualidade dos frutos na cultura da bananeira, e são os principais fatores limitantes para sua exploração comercial (NANSAMBA et al., 2020). Apesar da cultura da banana ser de fundamental importância, somente um pequeno número de cultivares apresenta potencial produtivo para a exploração comercial, resistência a pragas e doenças, e frutos com boas características de mercado (SILVA et al., 2013).

**Tabela 1.** Produção brasileira de banana por estado em 2021.

Estados	Área Colhida (ha)	Produção (t)	Rendimento (t/ha)
São Paulo	48,013	1.007.343	20,98
Bahia	65,450	869.088	13,28
Minas Gerais	47,044	791.746	16,83
Santa Catarina	29,646	708.983	23,91
Pernambuco	43,180	483.107	11,19

Fonte: Adaptado de Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2020.

### 2.3 Problemas fitossanitários

O cultivo de banana pode ser afetado por estresses bióticos e abióticos, que pode resultar em perdas de até 100% da produção da fruta. Os principais estresses abióticos enfrentados por esta monocotiledônea são seca, baixa temperatura e alta salinidade (AGARWAL et al., 2006). Algumas dessas condições induzem inúmeros distúrbios fisiológicos, devido a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), afetando assim o rendimento da produção (RAMÍREZ-SÁNCHEZ; HUBER; VALLEJOS, 2022). Além dos fatores abióticos, o cultivo de *Musa* é afetado por doenças causadas por vírus, fungos, bactérias, nematoides e insetos, que, encontrando condições favoráveis ao seu desenvolvimento, são capazes de causar grandes prejuízos em lavouras (TRIPATHI; NTUI; TRIPATHI, 2019). Dentre os fatores bióticos causadores de doenças em *Musa* podemos destacar os fungos. Os principais agentes causadores de doenças fúngicas em bananeiras são *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Pseudocercospora fijiensis* e *P. musae*, agentes etiológicos do Mal-do-panamá, Sigatoka-negra e Sigatoka-amarela, respectivamente (CORDEIRO; MATOS; HADDAD, 2016).

O manejo do complexo das doenças de Sigatoka- amarela e Sigatoka-negra é, em geral, quase que totalmente dependente de tratamentos frequentes (semanais) com fungicidas ao longo da estação de crescimento (FRIESEN, 2016). Estima-se que o custo do controle utilizando

fungicidas seja em torno de US \$ 1.000/ha por ano para grandes plantações. A aplicação constante de fungicidas a base de cobre, como forma de controle desses patógenos, tem um impacto socioeconômico significativo, que inclui riscos ambientais e à saúde humana (DE BELLAIRE et al., 2010). Além do que, o uso recorrente de fungicidas como o principal meio de controle das doenças, resulta na resistência a várias classes de fungicidas (CHURCHILL, 2011; FRIESEN, 2016; KIMATI et al., 1997; MARÍN et al., 2003). Os tratamentos a base de fungicidas usados para controlar o complexo da doença de Sigatoka, não é uma prática sustentável, portanto, outras soluções de controle são necessárias. A alternativa mais eficaz e eficiente de controle da doença é o uso de cultivares de bananeira resistentes obtidas através da seleção realizada dentro dos recursos genéticos existentes, ou a partir do melhoramento genético, com a geração de novas cultivares (FRIESEN, 2016).

#### **2.4 Sigatoka-amarela**

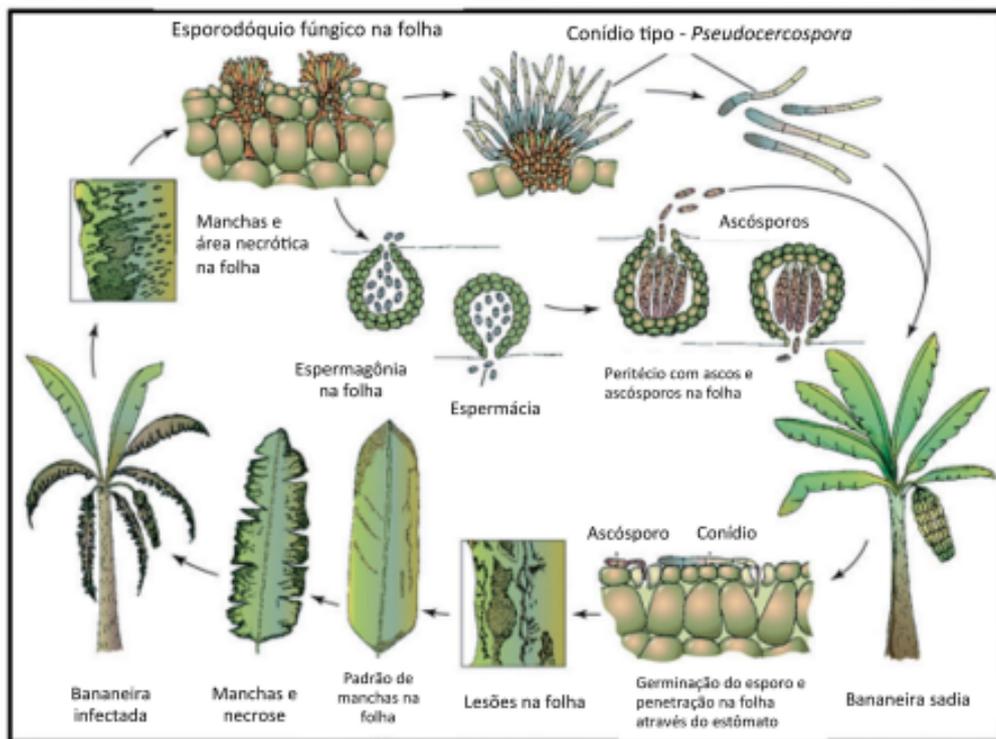
A Sigatoka-amarela é causada por *Mycosphaerella musicola*, Leach (teliomórfica ou sexuada) e *P. musae* (Zimm) Deighton (forma anamórfica ou assexuada). A doença foi relatada pela primeira vez em Java em 1902, e seu primeiro surto ocorreu no vale de Sigatoka na ilha de Viti Levu, em Fiji em 1913 (MOURICHON; CARLIER; FOURÉ, 1997). Foi neste vale que se pôde presenciar, pela primeira vez, a ocorrência dessa doença de forma epidêmica, por isso o nome popular Sigatoka-amarela. Posteriormente, esta doença foi identificada na Ásia, África, Américas Central e do Sul e Caribe, tendo rapidamente se tornado uma das mais importantes patologias para a cultura da bananeira (MEREDITH, 1969). No Brasil, a Sigatoka-amarela foi constatada, pela primeira vez, no estado do Amazonas, em 1944 (CORDEIRO; KIMATI, 1997), disseminando-se, posteriormente, por todos os estados brasileiros. *P. musae* encontra-se disseminada em todas as regiões produtoras de banana do Brasil e do mundo, provocando consideráveis prejuízos na produção de frutos.

Dois tipos de esporos estão envolvidos no aparecimento da doença: o esporo sexuado, ascósporo, e o assexuado, o conídio. A diferença de comportamento entre eles, podem refletir na epidemiologia da doença, que é muito influenciada pelas condições climáticas (CORDEIRO; MATOS; FILHO, 2004). A Sigatoka-amarela é beneficiada de forma direta pelas condições climáticas, tais como, chuva, orvalho e temperatura que são fundamentais para que ocorram a infecção, produção e disseminação do inóculo, causando perdas médias de 50% na produção dos frutos das variedades suscetíveis (BORGES; MATOS, 2006).

*P. musae* é um patógeno hemibiotrófico, cuja infecção começa com os esporos sendo depositados nas superfícies das folhas da bananeira e infectando as células do hospedeiro por

meio dos poros estomáticos. A fase biotrófica pode demorar algumas semanas, as folhas atacadas pela doença diminuem a atividade fotossintética e, como consequência, ocorre lançamento de cachos menores, maturação anormal da fruta, coloração anormal da polpa e alteração no sabor (CORDEIRO; MATOS; FILHO, 2004). O patógeno pode produzir três tipos de frutificações nas manchas foliares em bananeiras: esporodóquios, espermagônios e peritécios (STOVER, 1970). O processo sexuado de *Mycosphaerella* envolve a formação de espermogônios, que produzem gametas masculinos, as espermacias e o órgão sexual feminino, uma hifa espiralada, que é formada no interior de jovens ascocarpos, denominadas de tricogines (STOVER, 1980). Os espermogônios são encontrados mais frequentemente por volta do final do ano em folhas manchadas e secas, ainda aderidas aos pseudocaulos. Em escala macroscópica, os espermogônios, de alguma forma, assemelham-se às pontuações negras formadas pelas frutificações conidiais, porém, com um formato melhor delimitado. Estas estruturas podem ser formadas em ambas as superfícies foliares, porém com maior predominância na abaxial (SIMMONDS, 1966) (Figura 2).

Em estudos realizados por Freitas e colaboradores (2017), foi visto que a infecção por *P. musae* inicia-se com a germinação dos esporos na face abaxial das folhas de bananeira, após 12h a 36h, com a presença de umidade. Os tubos germinativos penetram os estômatos após 4 a 6 DAI (dias após inoculação) em ambiente de alta umidade e temperatura acima de 20°C. Aos 36 DAI, é observada a colonização do parênquima esponjoso e, aos 50 DAI, também do parênquima paliçádico. Assim que a infecção está bem estabelecida, após 50 DAI, as hifas emergem dos estômatos na região da lesão, na face adaxial foliar, formando os conidióforos em forma de esporodóquios (Figura 2) (FREITAS et al., 2017; STOVER, 1980).



**Figura 2.** Ciclo de vida de *P. musae*, agente causal da Sigatoka-amarela da bananeira. Adaptado de AGRIOS, 2005.

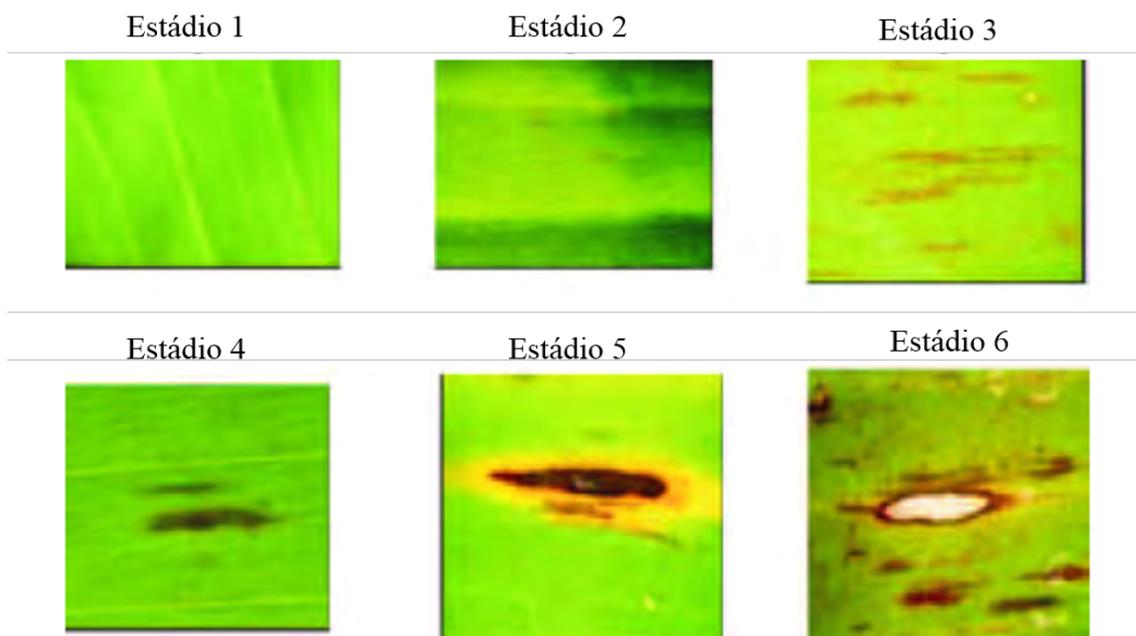
Na fase assexuada, o fungo produz conidióforos, os quais originam mitosporos denominados conídios (AGRIOS, 2005). Essas estruturas são produzidas em esporodóquios, sobre estromas de coloração marrom-escuro, medindo 15 a 35 micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), nas faces adaxial e abaxial do limbo, com predominância na face adaxial. Os conídios são produzidos durante o dia em ambientes úmidos de forma contínua, sendo disseminados pela água acumulada na superfície foliar durante as chuvas ou orvalho (CORDEIRO; ROCHA; ARAÚJO, 2011). Os ascósporos são produzidos nas mesmas lesões onde foram liberados os conídios anteriormente, porém, surgem mais tardiamente, sendo ejetados a partir dos pseudotécios em períodos de alta umidade à noite, ou mesmo durante o dia quando há ocorrência de orvalhos pesados (SIMMONDS, 1966).

Durante a estação seca, a produção de conídios é diminuída, mas os mesmos se mantêm presentes em lesões, sendo produzidos em noites com 10 a 12 horas de orvalho (CORDEIRO; ROCHA; ARAÚJO, 2011). Na ausência de um período chuvoso favorável à produção de ascósporo, os conídios são a maior fonte de inóculo. Por outro lado, a produção de conídios é muito sensível às temperaturas abaixo de  $22^{\circ}\text{C}$  e, em lesões mais antigas, os conídios podem se estender até por 30 dias se houver umidade (KIMATI et al., 1997).

## 2.5 Sintomatologia da Sigatoka-amarela

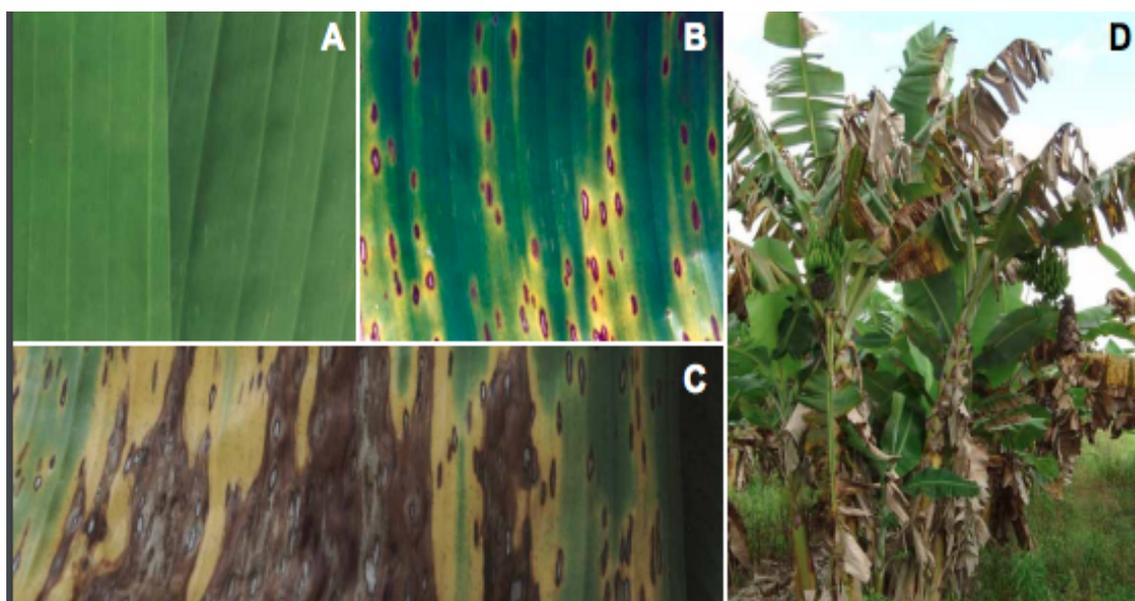
Todos os estádios de desenvolvimento dos sintomas da Sigatoka-amarela são visíveis a olho nu e podem ser observados na superfície superior (face adaxial) das folhas. As infecções causadas por Sigatoka-amarela ocorrem nas folhas mais jovens das plantas, incluindo as folhas zero (vela). Os primeiros sintomas da doença aparecem com uma leve descoloração do tecido em forma de ponto entre as nervuras secundárias da segunda a quarta folha a partir da “vela”, primeira folha contando de cima para baixo, considerada folha zero. O aumento das descolorações dá origem a estrias de tonalidade amarela, que com o tempo se tornam marrom, evoluindo para manchas pretas, necróticas, circundadas por um halo amarelo, tomando a forma elíptico-alongada (CORDEIRO; MATOS; FILHO, 2004). A lesão passa por vários estádios de desenvolvimento, conforme descrição a seguir:

- Estádio I- Fase inicial de ponto ou risca de no máximo 1 mm de comprimento, apresenta leve descoloração;
- Estádio II- É uma risca já apresentando vários milímetros de comprimento, com processo de descoloração mais intenso;
- Estádio III- A estria começa a alargar, aumenta de tamanho e começa a evidenciar coloração vermelho-amarronzada próximo ao centro
- Estádio IV- Aparece uma mancha nova, apresentando forma oval, alongada, com coloração parda, de contornos mal definidos;
- Estádio V- Caracteriza-se pela paralisação de crescimento do micélio, aparecimento de um halo amarelo em volta da mancha e início de esporulação do patógeno;
- Estádio VI- Fase final de mancha, de forma oval-alongada, com 12 mm a 15 mm de comprimento por 2 mm a 5 mm de largura, centro deprimido, de tecido seco e coloração cinza com bordos pretos e halo amarelado (KIMATI et al., 1997) (Figura 3).



**Figura 3.** Evolução das lesões na face adaxial foliar em *M. acuminata* causadas pela Sigatoka-amarela, cujo agente patogênico é *P. musae*, observadas em microscópio estereoscópio (CORDEIRO; MATOS; FILHO, 2004).

O coalescimento das lesões, formando extensas áreas necróticas geralmente ocorre em estádios mais avançados da doença, com presença de alta frequência de lesões (SIMMONDS, 1966). Esse é o maior dano provocado pela Sigatoka-amarela, ou seja, a morte prematura das folhas, causando redução da área foliar fotossintetizante, com consequências na qualidade da fruta e na produtividade (CORDEIRO; MATOS; FILHO, 2004). Manchas oriundas de infecções por ascósporos apresentam predominância apical, enquanto aquelas originadas a partir de conídios apresentam distribuição casualizada, mas com predominância basal, sendo comum a formação de linhas de infecção sobre o limbo foliar (KIMATI; FILHO; CAMARGO, 1997). Os sintomas característicos de Sigatoka-amarela podem ser observados na Figura 4.



**Figura 4.** Sintomas da Sigatoka-amarela causados por *P. musae*: estádios iniciais da doença (A); manchas elípticas (B); necrose foliar (C); perdas na produção (D) (CORDEIRO; MATOS; FILHO, 2004).

## 2.6 Controle de Sigatoka-amarela

Diversas medidas são utilizadas para controlar a Sigatoka-amarela, na agricultura moderna. O manejo integrado de pragas e doenças (MIP e MID) constitui o principal método de controle fitossanitário. Alguns exemplos são o uso de variedades resistentes, controle cultural, drenagem, combate às plantas infestantes, desfolha sanitária, nutrição, sombra e controle químico (CORDEIRO; MATOS; FILHO, 2004).

O manejo da Sigatoka-amarela é quase que totalmente dependente de aplicações semanais de fungicidas ao longo da estação de crescimento (FRIESEN., 2016). Além disso, são necessárias mais de 50 aplicações anuais de fungicidas dependendo do grau de infecção e da variedade utilizada (CORDEIRO; MATOS; KIMATI, 2005; JIMÉNEZ; BRIOSO, 2018). O controle químico recomendado para o controle da doença não fornece uma solução eficaz para os agricultores e também não é rentável, leva à poluição ambiental e também prejuízos à saúde humana. O uso constante de fungicidas reduz a eficácia e pode favorecer a seleção de patógenos resistentes (MARÍN et al., 2003; BRITO et al., 2015). A dependência de fungicidas mostra a importância da implementação de estratégias integradas para evitar a seleção de isolados do patógeno resistentes a fungicidas (MILLER et al., 2008b; BRITO et al., 2020). Considerando as limitações do uso de fungicidas, a busca por variedades resistentes, seja mediante a seleção

dentro dos recursos genéticos existentes, seja mediante a geração de novas variedades por hibridação, é hoje a principal linha de ação visando o controle de Sigatoka-amarela (AMORIM., 2012). Nesse contexto, o desenvolvimento e cultivo de híbridos ou variedades resistentes à doença representa uma solução tecnológica eficiente e eficaz para reduzir a incidência da doença e, conseqüentemente, perdas na cultura.

## **2.7 Melhoramento genético em *Musa***

A evolução da maioria das cultivares de banana ocorreu no continente Asiático a partir das espécies selvagens *M. acuminata* Colla e *M. balbisiana* Colla, cujas variedades apresentam níveis cromossômicos di, tri ou tetraplóides, com 22, 33 ou 44 cromossomos, em combinações variadas denominadas pelas letras A (*M. acuminata*) e B (*M. balbisiana*) resultando em genótipos com grupo genômico AA, BB, AB, AAA, AAB, ABB, AAAA, AAAB, AABB e ABBB (SIMMONDS & SHEPHERD, 1955). O melhoramento convencional tem sido dificultado pela ausência de sementes nas cultivares de bananeira, fator este que resulta da inexistência de pólen viável ou, talvez, de polinizadores naturais eficientes.

As cultivares que não produzem sementes quando polinizadas ou aquelas que as produzem em pequena quantidade podem ser tanto diplóides quanto triplóides. A maioria das cultivares comerciais de banana são triplóides estéreis, com frutos sem sementes desenvolvidos por partenocarpia, fenômeno comum em bananeira, caracterizado pelo desenvolvimento do fruto sem a necessidade de fertilização. O fato de a bananeira não produzir sementes contribui para a ausência de variabilidade genética, o que resulta em lavouras com pouca resistência a pragas e doenças (FERREIRA et al., 2015).

O uso de tecnologias não tradicionais, tais como técnicas de cultura *in vitro*, mutagênese e transformação genética oferecem potencial de utilização no melhoramento de bananeira. Com o advento da genética molecular, métodos eficientes de identificação de polimorfismo de DNA têm sido utilizados como ferramentas auxiliares nos programas de melhoramento genético. O uso de marcadores moleculares e da citogenética molecular têm dado importantes contribuições para o entendimento da organização e composição do genoma dessa espécie, avaliar a diversidade entre acessos e construir mapas genéticos para a espécie (AMORIM et al., 2012; CRUZ, 2013; MILLER et al., 2010).

A fim de promover o melhoramento genético de *Musa* e o desenvolvimento de cultivares resistentes, é necessário compreender quais são os mecanismos moleculares-chaves que controlam as respostas de resistência. Trabalhos importantes foram realizados em nível de transcrito usando a tecnologia de RNAseq, identificando unigenes potencialmente

envolvidos em respostas de defesa, caracterizadas na interação *Musa-Fusarium oxysporum* (FEI et al., 2019; SONG et al., 2018), *Musa-Meloidogyne incognita* (CASTAÑEDA et al., 2017) e *Musa-P. fijiensis* (D'HONT et al., 2012). Acredita-se que, com a disponibilização do genoma da DH Pahang (BELSER et al., 2021; D'HONT et al., 2012; MARTIN et al., 2016) aliada ao baixo custo do sequenciamento genômico, haverá um salto qualitativo e quantitativo quanto às informações relevantes sobre genes candidatos envolvidos na melhoria da qualidade dos frutos, bem como na mitigação dos principais fatores bióticos e abióticos que afetam a espécie.

## **2.8 Imunidade vegetal desencadeada por padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs)**

Na natureza as plantas estão constantemente expostas a uma série de patógenos, incluindo bactérias, vírus, nematoides e fungos. As plantas possuem numerosos receptores imunológicos intracelulares e de superfície celular, afim de reconhecer uma variedade de sinais imunológicos associados as infecções por patógenos (WANG et al., 2020; ZHOU; ZHANG, 2020). As plantas respondem à invasão de patógenos por meio de dois tipos diferentes de resposta imune, uma envolve a imunidade desencadeada por PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) ou PTI (*pathogen-triggered immunity*), e a outra envolve a imunidade desencadeada por efetores de patógenos, chamada de ETI (*effector-triggered immunity*) (BOLLER; HE, 2009; DANGL; JONES, 2001). Geralmente, PTI e ETI dão origem a respostas semelhantes, embora ETI seja qualitativamente mais forte e mais rápido e, frequentemente, envolva uma resposta de hipersensibilidade (HR).

O PTI é geralmente eficaz contra patógenos não adaptados, é um fenômeno denominado resistência de não hospedeiro, ao passo que o ETI é ativo contra patógenos adaptados. No entanto, essas relações não são exclusivas e dependem das moléculas eliciadoras presentes em cada infecção (BOLLER; HE, 2009). A primeira camada de defesa das plantas pode ser disparada por meio do reconhecimento dos PAMPs resultando na ativação de defesa basal (ou não hospedeiro) da planta. Em PTI, as moléculas dos patógenos são reconhecidas em plantas pelos receptores de reconhecimento de padrões (*PRRs*) (DANGL; JONES, 2001; MONAGHAN; ZIPFEL, 2012), que são localizados na superfície celular. Os PRRs são ativados em nível celular após reconhecer os PAMPs (DANGL; JONES, 2001; ZIPFEL, 2014). Os PRRs identificados nas plantas são receptores transmembrana que apresentam dois tipos estruturais básicos; *receptor-like kinases (RLKs)*, que possuem um domínio quinase intracelular

na região C-terminal, e receptor-*like proteins* (RLPs), que não possuem esse motivo (ZIPFEL., 2014).

As plantas também respondem a moléculas endógenas liberadas pela invasão de patógenos, como a parede celular ou fragmentos cuticulares chamados de padrões moleculares associados a danos (DAMPs –Damage-associated molecular patterns ) (DODDS; RATHJEN, 2010). Os receptores PRRs são bem conhecidos em plantas e são específicos para cada padrão molecular, os mais conhecidos são: *FLS2* e *EFR*, do tipo *LRR-RLK*, capazes de reconhecer a flagelina (*flg22*); e os receptores *Lys-MRLK1 CERK1* e *LysM-RLP CEBiP* responsáveis pelo reconhecimento da quitina fúngica, desencadeando as respostas de defesa do tipo PTI (BOLLER; HE, 2009). A ativação dos *PRRs* após o reconhecimento dos PAMPs desencadeia uma série de respostas de defesa, afim de bloquear o avanço do patógeno no hospedeiro, estes incluem; aumento de íons de cálcio no citosol, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), cascata de sinalização MAP quinases (MAPKs - *Mitogen-Activated Protein Kinases*) e ativação de fatores de transcrição do tipo *WRKY* (YUAN et al., 2021; ZHOU; ZHANG, 2020).

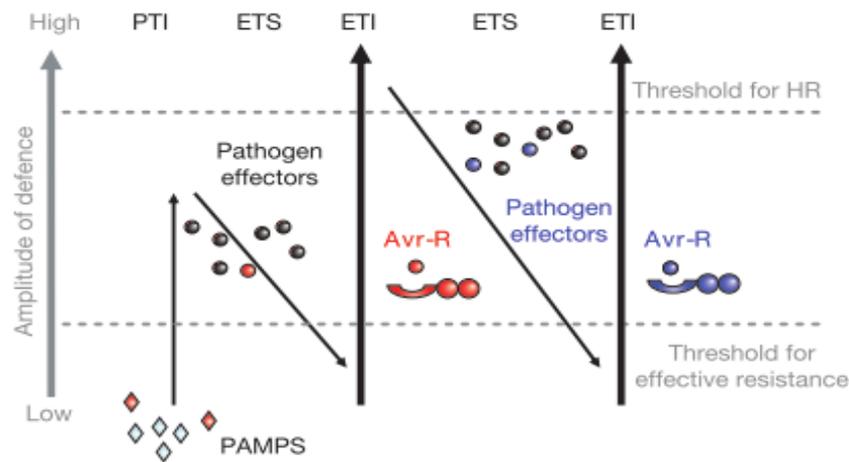
## 2.9 Imunidade vegetal desencadeada por efetores (ETI)

Os patógenos, por sua vez, podem responder com diversos fatores de virulência para suprimir as defesas do hospedeiro. Na tentativa de driblar o PTI, os patógenos adaptados entregam proteínas efetoras dentro das células vegetais, manipulando as funções celulares a seu favor e interferindo nas respostas de defesa, resultando na suscetibilidade desencadeada por efetores (*effector-triggered susceptibility* - *ETS*) (JONES; DANGL, 2006; YANG; HUANG, 2014). As plantas também possuem um sistema que detecta a presença das moléculas efetoras dentro de seus tecidos e células. Esse sistema é composto por receptores específicos (proteínas R) codificadas por genes R da planta (BOLLER; FELIX, 2009; JONES; DANGL, 2006).

As proteínas R, também chamadas de receptor intracelular ligante de nucleotídeos e domínios ricos em leucina (NLRs – *nucleotide-binding, leucine rich domains*), possuem um domínio rico em leucina (LRR – *leucine rich region*), um domínio de ligação ATPase (NB – *nucleotide binding ATPase*) e um domínio TIR (*Toll interleukin-1 receptor*) ou CC (*coiled coil*) formando as proteínas TIR-NB-LRR ou CC-NB-LRR, respectivamente (DODDS; RATHJEN, 2010). Estas são codificadas por genes R cujos produtos efetivamente reconhecem os efetores, por meio da interação gene a gene, e ativam uma segunda linha de defesa, conhecida como imunidade desencadeada por efetores (ETI), anteriormente conhecida como resistência gene-a-gene ou resistência raça-específica (JONES; DANGL, 2006).

As proteínas NLR são codificadas pelos genes R que, por serem genes com elevado efeito no fenótipo, são aqueles comumente utilizados em programas de melhoramento para a obtenção de genótipos com resistência qualitativa (LI; KAPOS; ZHANG, 2015). A relação entre o gene R da planta e o gene *Avr* (*avirulence*) do patógeno foi base para o estabelecimento da hipótese da interação gene-a-gene entre planta e patógeno também conhecida como Teoria de Flor (FLOR 1971), a qual destaca a especificidade do reconhecimento entre a proteína R e sua proteína *Avr* (efetor) (LI; KAPOS; ZHANG, 2015). Inúmeros genes R de plantas já foram caracterizados até o momento, pelo menos cinco classes de genes R são reconhecidas, com base na organização de motivos de aminoácidos conservados e seus domínios de membrana. Os exemplos dessa classe de genes de resistência incluem, *RPS2* e *RPM1* que conferem resistência a *Pseudomonas syringae* em *Arabidopsis* (REUBER; AUSUBE, 1996), e *I2* que confere resistência a raça 2 de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* em (*Solanum lycopersicum*) (WEI et al., 2014). *RRS1* que reconhece o efetor *PopP2* de *Ralstonia solanacearum*, *RPP1* que reconhece o efetor *Atr1* de *Hyaloperonospora* (LI; KAPOS; ZHANG, 2015).

A evolução do sistema imune vegetal foi representada em quatro etapas, em um modelo denominado “zigue-zague”, proposto por Jones e Dangl (2006) (Figura 5). Na primeira fase, as plantas detectam os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs/MAMPs), desencadeando uma resposta de imunidade conhecida como imunidade desencadeada por padrões (PTI). Na segunda fase, patógenos entregam com sucesso efetores que interferem na PTI, desencadeando a ETS. Na terceira fase, um efetor é reconhecido pelas proteínas NB-LRR, ativando a imunidade desencadeada por efetores (ETI), uma versão ampliada de PTI que muitas vezes induz a resposta de hipersensibilidade (HR). Na quarta fase, novos efetores surgem através do fluxo horizontal de genes, o que pode suprimir a ETI. A seleção favorece também a evolução de novos alelos NB-LRR capazes de reconhecer os efetores recém-adquiridos, resultando na ativação das respostas de ETI novamente.



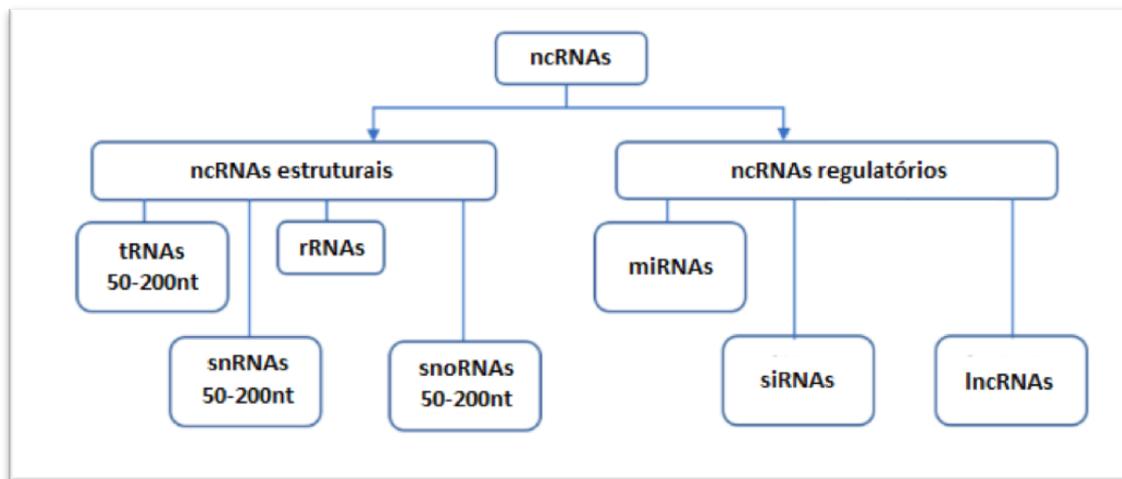
**Figura 5.** Modelo “zigzag” do sistema imune em plantas (JONES e DANGL, 2006). Na primeira fase, as plantas detectam os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs, diamantes vermelhos), desencadeando uma resposta de imunidade (PTI). Na segunda fase, patógenos entregam com sucesso efetores que interferem na PTI, ativando a susceptibilidade desencadeada por efetores (ETS). Na terceira fase, um efector (indicado na figura em vermelho, Avr) é reconhecido pelas proteínas NB-LRR, ativando a imunidade desencadeada por efetores (ETI), uma versão ampliada de PTI que muitas vezes induz a resposta de hipersensibilidade (HR). Na quarta fase, novos efetores podem surgir através do fluxo horizontal de genes (em azul), ajudando os patógenos a suprimir a ETI. A seleção por parte das plantas de novos alelos de proteínas NB-LRR, que podem reconhecer um dos efetores recém adquiridos, dispara novamente a ETI.

As respostas de ETI são mais rápidas e mais robustas quando comparadas às de PTI, e geralmente resultam em resposta de hipersensibilidade (HR) é caracterizada pela explosão oxidativa, que consiste na geração de superóxido ( $O_2^-$ ) e acúmulo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs), alteração nos níveis de hormônios vegetais tais como; ácido salicílico (SA) e ácido jasmônico (JA), acúmulo de proteínas relacionadas a patogênese (PR), resistência sistêmica adquirida (SAR) pode ocorrer, conferindo uma resposta a uma ampla gama de hospedeiro que aumenta sua resistência a qualquer ataque de patógeno subsequente (SOARES et al., 2021). As duas linhas de defesa inata PTI e ETI podem ativar as mesmas respostas, contudo, a ETI é mais específica (TAO et al., 2003).

## 2.10 RNAs não codificantes (ncRNA)

Os genomas dos eucariotos codificam milhares de RNAs não codificantes que desempenham papéis cruciais na regulação transcricional e pós-transcricional da expressão gênica (MATTICK, 2001; TAY; RINN; PANDOLFI, 2014). As famílias de ncRNAs são

agrupadas em ncRNA estrutural e regulatório com base em sua estrutura e função, RNAs regulatórios: RNAs não codificantes longos (lncRNAs), RNAs circulares (circRNAs) e pequenos RNAs não codificantes (sRNAs), que são, principalmente, microRNAs (miRNAs) e pequenos RNAs interferentes (siRNAs) (BARTEL, 2004; VAUCHERET; MALLORY; BARTEL, 2006). Os ncRNA estruturais incluem o RNA transportador (tRNA), RNA ribossômico (rRNA), pequenos RNAs como RNAs nucleares (snRNA) e os pequenos RNAs nucleolares (snoRNAs) (QU et al., 2016) (Figura 6). O acúmulo de evidências indica que os ncRNAs, especialmente os miRNAs e os ncRNAs longos (lncRNAs), surgiram como moléculas regulatórias essenciais nas respostas ao estresse das plantas (WANG et al., 2017).



**Figura 6.** Diferentes grupos de RNAs não codificantes (ncRNAs estruturais e ncRNAs regulatórios) e seus respectivos subgrupos. Imagem adaptada de BHOGIREDDY et al. (2021).

### 2.10.1 microRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNAs dupla-fita endógenos não codificantes com ação regulatória, com aproximadamente 20-24 nucleotídeos (nt) de tamanho (embora a maioria dos miRNAs seja composta por espécies com 20-22nt), cuja principal função é regular em nível pós-transcricional RNAs mensageiros (mRNA) alvo por meio do pareamento de bases específico, resultando na clivagem do mRNA ou na inibição de sua tradução (BAULCOMBE, 2004).

Desse modo, os miRNAs são moléculas conhecidas pela capacidade de controlar a expressão de genes nas células da maioria dos organismos eucariotos (CUI; YOU; CHEN, 2017) e funcionam como moléculas guia em diversas vias de silenciamento gênico (LEE et al., 2004). O primeiro miRNA foi descrito em 1993, com o *lin-4* (*lineage-deficient-4*) identificado

como regulador pós-transcricional do gene *lin-14*, que está envolvido no controle do desenvolvimento larval do nematoide *Caenorhabditis elegans*. Foi descoberto que o gene *lin-4* não codificava uma proteína, mas expressava um pequeno RNA de aproximadamente 22 nucleotídeos. Essa descoberta permitiu a descrição de um então novo mecanismo de regulação gênica, pelo qual o transcrito de *lin-4* regula negativamente a tradução do transcrito de *lin-14* (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993). Em plantas, os miRNAs desempenham papéis importantes no desenvolvimento, crescimento, sinalização hormonal, formação de raízes laterais, tempo de floração, metabolismo, imunidade inata e resposta ao estresse biótico e abiótico (SUNKAR; JAGADEESWARAN, 2008). A identificação de miRNAs por meio de ferramentas de bioinformática é um dos métodos mais utilizados, contribuindo para a descoberta de novos miRNAs em sistemas animais e vegetais. Isso se deve, em grande parte, ao baixo custo, alta eficiência, metodologia rápida e abrangente de bioinformática. A principal teoria por trás dessa abordagem é encontrar sequências homólogas de miRNAs conhecidos tanto dentro de um único genoma quanto entre genomas de organismos relacionados (LAGOS-QUINTANA et al., 2001; LEE; AMBROS, 2001). Por meio de programas computacionais, tais como Shortstack é possível fazer a predição de novos miRNAs, o programa realiza uma série de análise dos critérios necessários para a anotação de um novo miRNA de planta (AXTELL, 2013).

Com base nesses critérios, o programa classifica cada sequência em Y (sim), quando atende a todos os requisitos, N15, quando atende todos os requisitos, porém o miRNA\* está ausente, e N1-N14 quando algum dos critérios não foi atendido.

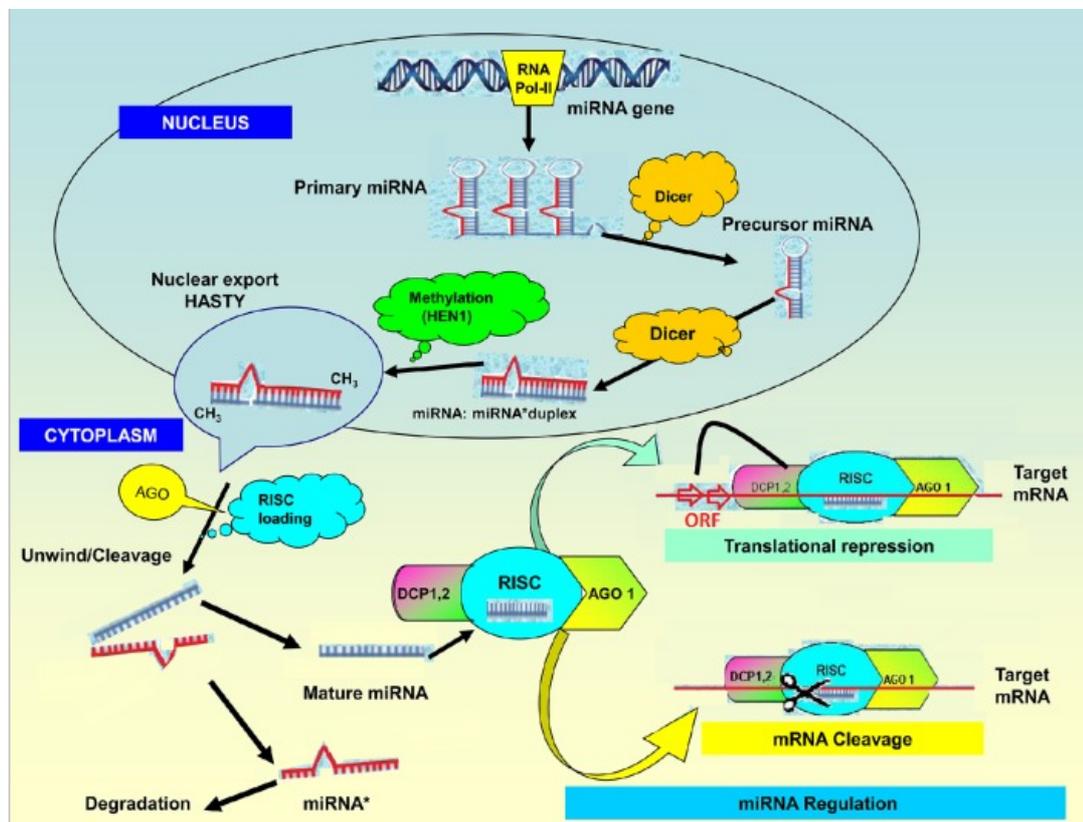
Estratégias computacionais e experimentais têm demonstrado que muitos miRNAs, assim como seus alvos, são conservados entre espécies, como por exemplo em arroz (monocotiledônea) e *Arabidopsis thaliana* (eudicotiledônea) (WANG et al., 2004; ZHANG et al., 2018). A identificação de miRNAs levou a criação de banco de dados contendo informações pesquisáveis sobre miRNAs. A ferramenta mais utilizada é o miRBase (<http://www.mirbase.org>) que é um banco de dados de miRNA – contendo dados extensos de miRNAs de plantas (GRIFFITHS-JONES et al., 2008)..

### **2.10.2 Biogênese dos miRNAs**

A biogênese dos miRNAs em plantas se inicia no núcleo a partir da transcrição do miRNA primário (pri-miRNA) a partir de genes MIR, promovida pela enzima RNA polimerase II (Pol II) (LEE et al., 2004) (Figura 7). O transcrito primário, possuindo um *cap* 7- metilguanossina em sua extremidade 5' e uma cauda poli-A na extremidade 3', então, convertido em

um precursor, o pré-miRNA, pela ação da enzima *DICER LIKE 1 (DCL1)*. Nesse passo, há a interação da *DCL1* com a proteína nuclear *HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1)*, que, por sua vez, interage com a proteína *SERRATA (SE)*. Em seguida, o miRNA precursor é clivado pela *DCL1* em um duplex de RNA, formado pela fita guia ou miRNA maduro e pela fita complementar, denominada miRNA\* ou miRNA star. O duplex miRNA/miRNA\* é metilado pela enzima metiltransferase nuclear HEN 1, prevenindo assim sua degradação (YU et al., 2005), o duplex é transportado do núcleo para o citoplasma com ajuda da enzima HASTY (HST) (PARK et al., 2005). No citoplasma, o duplex miRNA: miRNA\* é separado e o miRNA maduro é incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (*RISC*) que contém a enzima ARGONAUTA 1 (*AGO1*), enquanto o miRNA\* é excluído do *RISC* e, conseqüentemente, exposto para degradação. Finalmente, o miRNA maduro orienta a proteína (*AGO*) para os mRNAs alvo por complementariedade.

Os miRNAs que possuem complementaridade alta com os mRNAs alvos levam à clivagem do mRNA, enquanto que os miRNAs com bases mal pareadas com o mRNA alvo conduzem à inibição da tradução (DJAMI-TCHATCHOU et al., 2017). Todavia, um único miRNA pode regular a expressão de vários mRNAs, e uma única molécula de mRNA pode ser regulada por múltiplos miRNAs (BRENNECKE et al., 2005).



**Figura 7.** Modelo da biogênese e mecanismos de ação de miRNAs em plantas. Adaptado de DJAMI-TCHATCHOU e colaboradores (2017).

### 2.10.3 miRNAs em plantas

Os miRNAs encontrados em plantas regulam diversos processos biológicos e fisiológicos por meio da interação com seus mRNAs alvo. Estes incluem: vias regulatórias que controlam o desenvolvimento da planta, reprodução, metabolismo, transdução de sinal e resposta a estresses bióticos e abióticos (LIU; CHEN, 2010; SHUKLA; CHINNUSAMY; SUNKAR, 2008; ZAMORE; HALEY, 2005).

#### **miRNAs em resposta a estresses abióticos**

No que diz respeito a estresses abióticos, numerosos miRNAs foram caracterizados em respostas de plantas MUTHUSAMY *et al* (2014), por exemplo, evidenciaram o aumento da expressão dos miR156, miR169 e miR211 em *Musa* em condição de déficit hídrico. Estudos evidenciam também que, em arroz, o miR393 (OsmiR393) tem como alvo dois genes homólogos de receptores de auxina (OsTIR1 e OsAFB2), e que este miRNA foi altamente expresso em condição de seca (XIA *et al.*, 2012).

Em outros estudos relacionados a temperaturas extremas de frio ou calor, foram identificados vários miRNAs (miR167, miR319, miR812q e miR1425) (SHRIRAM *et al.*, 2016), que desempenham papéis importantes na modulação da expressão de seus genes alvos em resposta a condição de frio. O miR397 também foi relatado como um miRNA que responde e modula a expressão de L-ascorbato oxidase (OsLAC) em resposta ao estresse térmico e à adaptação do arroz em altas temperaturas (ZHAI *et al.*, 2011).

#### **miRNAs em resposta a estresses bióticos**

No que diz respeito às respostas imunes das plantas, diversos miRNAs foram identificados em diferentes patossistemas, por exemplo, no tomate durante a interação com *Phytophthora infestans* (LUAN; CUI; ZHAI, 2015), em *Camellia sinensis* durante a infecção por *Colletotrichum gloeosporioides* (JEYARAJ *et al.*, 2019), arroz durante interação com *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (JIA *et al.*, 2020), em *Triticum aestivum* durante interações com o patógeno da ferrugem da folha *Puccinia triticina* (DUTTA *et al.*, 2019), e o patógeno do oídio *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* (XIN *et al.*, 2010).

O envolvimento considerável de miRNAs de plantas em ramos específicos do sistema imune inato também foi identificado. Estes incluem, por exemplo, miRNAs como miR393, que

suprime a sinalização de auxina e contribui para a imunidade desencadeada por PAMP (PTI) (NAVARRO et al., 2006), bem como miR482 e miR5300, que demonstraram regular a expressão do gene NLR em respostas imunes desencadeadas por ETI nas Solanaceae (JIANG et al., 2018; OUYANG et al., 2014; SHIVAPRASAD et al., 2012).

Os miRNAs estão envolvidos na regulação de uma variedade de sinais e vias de defesa, incluindo expressão gênica dos NBS-LRR, sinais hormonais, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Grande parte dos miRNAs tem como alvo os genes de defesa NBS-LRR (PARK; SHIN, 2015). Foi relatado que o miR482 modula a resistência da batata ao suprimir os genes NBS-LRR durante a infecção por *Verticillium dahliae* (YANG et al., 2015). Além disso, o miR482 e o miR5300 demonstraram regular a expressão do gene NLR em respostas imunes desencadeadas por efetores (ETI) em Solanaceae (OUYANG et al., 2014; SHIVAPRASAD et al., 2012). Uma série de miRNAs foram validados em resposta imune a patógenos fúngicos e bacterianos, entre eles, miR393, miR396, miR773, miR858, miR844, miR400, miR398, miR160, miR159, miR168 e miR162 em *Arabidopsis thaliana* (BUNDÓ et al., 2020).

### **miRNAs em *Musa***

Um número limitado de investigações em todo o genoma em miRNAs de *Musa* foi conduzido até o momento. Com base nas abordagens de predição do genoma, um total de 266 miRNAs em 47 famílias foi previsto no genoma A (*M. acuminata* Colla) (D'HONT et al., 2012), com 270 membros em 42 famílias previstas no genoma B (*M. balbisiana* Colla) (DAVEY et al., 2013). Os miRNAs também foram caracterizados em *Musa* sob diferentes estresses de temperatura (VIDYA; RAVISHANKAR; LAXMAN, 2018; ZHU et al., 2019) e em cultivares contrastantes em resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (SONG et al., 2016). Recentemente, Song e colaboradores (2018) também caracterizaram os padrões de expressão de miR169 em *Musa* após infecção de *F. oxysporum* f. sp. cubense raça tropical 4. Fei et al (2019) também relataram mais de 110 miRNAs maduros durante a interação do tecido da raiz da bananeira Cavendish com *F. oxysporum* f. sp. cubense raça tropical 4 e *F. oxysporum* f. sp. cubense 1.

### 3. JUSTIFICATIVA

A Sigatoka-amarela pode ocasionar perdas de até 100% na produção de banana, em microclimas favoráveis, e o controle dessa doença é realizado, principalmente com fungicidas à base de cobre, o que representa mais de 30% dos custos totais de produção da fruta. Tendo em vista que a Sigatoka-amarela que acomete as bananeiras vem sendo tratada principalmente com a aplicação de agroquímicos, potencialmente danosos ao meio ambiente, atualmente o desenvolvimento de plantas resistentes tem sido considerado como a forma mais eficiente no controle desta doença.

Considerando as limitações do melhoramento convencional de *Musa*, a genômica pode ser utilizada para a prospecção de genes envolvidos nas respostas de defesa contra o patógeno *P. musae*, organismo causador da Sigatoka-amarela. Os miRNAs envolvidos na via de resposta imune de *M. acuminata*-*P. musae* que forem identificados nesse estudo poderão contribuir para a elucidação dos mecanismos de resistência em *Musa* e, potencialmente, beneficiarão futuros programas de melhoramento da espécie para a geração de novos genótipos resistentes.

Diante disso, foi realizado o sequenciamento de sRNAs em *M. acuminata* durante a interação com *P. musae*. As amostras de sRNAs de folhas foram então sequenciadas via Illumina HiSeq 2500 e as sequências de alta qualidade foram mapeadas contra o genoma de referência *M. acuminata* ssp. *malaccensis* var. DH Pahang. O genótipo de bananeira utilizado para o sequenciamento foi *M. acuminata* subsp. *burmannicoides*, var. Calcutta 4, devido à sua resistência à Sigatoka-amarela. Este é um diploide fértil selvagem, amplamente empregado em programas de melhoramento, sendo uma importante fonte de resistência a fungos e nematoides patogênicos (MILLER et al., 2010).

Também foi realizada a análise da expressão diferencial dos miRNAs e dos seus genes alvos em *Musa* que foram identificados nos dados de sequenciamento, e que estão potencialmente envolvidos nas vias de sinalização de respostas de defesa da planta, através de PCR em tempo real (RT-qPCR). A caracterização de miRNAs em *M. acuminata* e seu papel na modulação da expressão gênica durante a interação com *P. musae* fornece recursos para o desenvolvimento de métodos eficientes de controle da Sigatoka-amarela.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

- Identificar, caracterizar e validar os principais miRNAs potencialmente envolvidos na defesa da planta *M. acuminata* var. Calcutta 4 (resistente) durante a interação com *P. musae*.

### 4.2 Objetivos Específicos

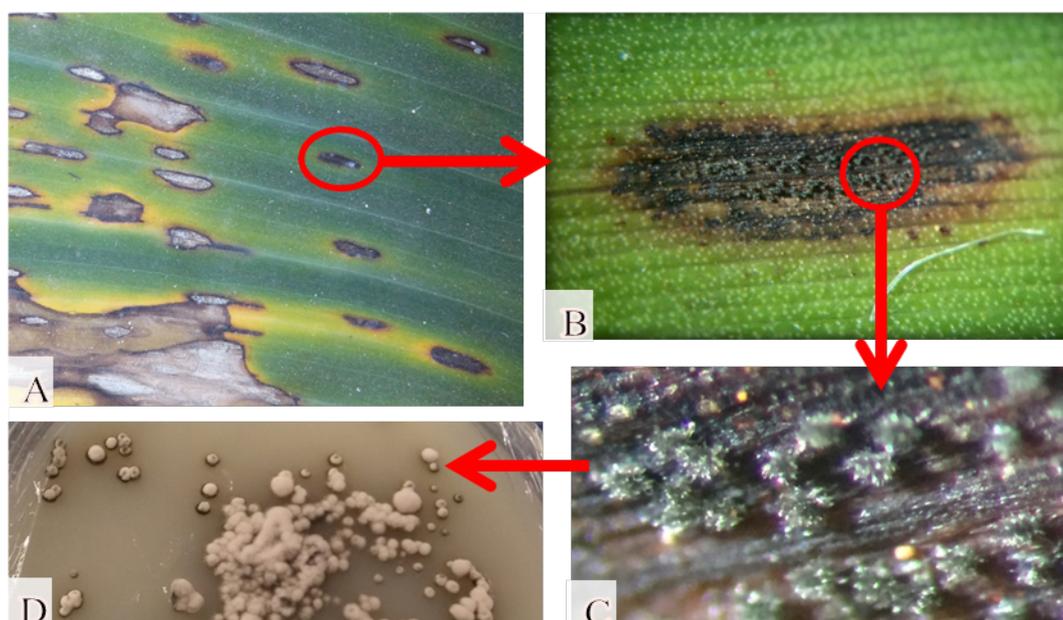
- Extrair RNA total de folhas de *M. acuminata* Calcutta 4 (resistente) inoculadas e não-inoculadas com o patógeno *P. musae*;
- Sequenciar os smallRNAs presentes em amostras extraídas de *M. acuminata* Calcutta 4 inoculadas e não inoculadas utilizando a tecnologia Illumina;
- Identificar possíveis miRNAs;
- Analisar a expressão diferencial de miRNAs identificados;
- Classificar os miRNAs conservados de acordo com família e contribuir com novos dados genômicos para este gênero;
- Predição de estrutura secundária dos novos microRNAs *in silico*;
- Identificar os alvos gênicos de miRNAs em *M. acuminata* Calcutta 4;
- Analisar os níveis de expressão gênica de genes alvo em dados de transcritômica obtidos por RNA-Seq em projetos anteriores, para confirmar o possível papel destes miRNAs na regulação da expressão de genes da planta;
- Caracterizar o padrão de expressão dos miRNAs e seus genes alvo nos tratamentos realizados por PCR quantitativa em tempo real.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Coleção de isolados de *P. musae*, identificação, crescimento e manutenção

A coleção de *P. musae* possui seis isolados: 018bBA – proveniente da Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), Cruz das Almas, BA; 01EB, 12EB, 15EB, 55EB e 90EB – isolados em Brasília. As cepas de Brasília foram isoladas a partir de folhas de bananeira com lesões características de Sigatoka-amarela, coletadas na Estação Experimental de Biologia da Universidade de Brasília (UnB) (Brasília-DF). Foi realizado o isolamento direto de cepas de *P. musae* com o auxílio de lupa estereoscópica.

Os conidiósporos, coletados do centro dos esporodóquios, foram transferidos para meio de cultura V8 (50 mL de suco Campbell's V8, 1g de CaCO<sub>3</sub>, 9g de Ágar, 450 mL de água destilada, 167 mg de Cloranfenicol), e mantidos sob temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12h (Figura 8). Após 30 dias de crescimento, as colônias foram maceradas em cadinho e pistilo, com a adição de 5 mL de água destilada estéril. Um total de 300 µL desta suspensão foi transferido para novas placas de Petri contendo meio de cultura V8. Em seguida, a suspensão foi espalhada com auxílio de alça de Drigalski. As placas foram mantidas sob temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12h por 10 dias. Todas as cepas foram preservadas utilizando o método de Castellani, em papel filtro e em glicerol 10%.



**Figura 8.** Isolamento direto de *Pseudocercospora musae* a partir de lesões de Sigatoka-amarela em folhas de bananeira. A e B- Lesão adaxial; C- Esporodóquios (contendo os conídios); D- Fungo crescido em meio de cultura V8.

## 5.2 Extração de DNA genômico de *P. musae*

A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com o protocolo de GONZÁLEZ-MENDOZA et al. (2010), com adaptações. Para isso, os seis isolados foram cultivados em meio de cultura V8 durante um período de 30 dias, a 25°C e fotoperíodo de 12h. Em seguida, o micélio foi macerado em nitrogênio líquido. Os materiais resultantes das macerações foram transferidos para microtubos de 1,5 mL e adicionou-se 500 µL da solução de tampão de extração (Tris HCl 200 mM, pH 8,5; EDTA 25 mM; SDS-Sódio Dodecil-Sulfato 0,5% e água ultra-pura). Após a homogeneização, foram adicionados 350 µL de fenol e 150 µL de clorofórmio, e a solução homogeneizada e centrifugada a 11,800 x g a 4 °C por 30 mi. O sobrenadante foi coletado e transferido para novos microtubos de 1,5 mL, e para a eliminação do RNA total adicionou-se 10 unidades de Ribonuclease A, e em seguida as amostras foram incubadas a 37 °C por 15 min. Subsequentemente, foi adicionado aproximadamente 1 mL de clorofórmio ao volume coletado. Em seguida, efetuou-se nova centrifugação a 11.800 x g por 10 min, com o sobrenadante coletado e transferido para um novo microtubo de 1,5 mL. O DNA foi precipitado com a adição de isopropanol gelado na proporção de 0,54 vezes do volume coletado. As amostras foram novamente centrifugadas por 2 min à temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 200 µL de etanol 70%, seco, ressuscitado em 50 µL de TE (Tris-HCL 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) e armazenado a -20 °C.

## 5.3 Identificação molecular de *P. musae*

Para confirmação da identificação molecular dos seis isolados de *P. musae*, quatro regiões genômicas foram amplificadas e sequenciadas: ITS (*Internal transcribed spacer*) do rDNA (DNA ribossômico), e partes dos genes da actina (*ACT*), fator de alongação 1α (*EF1α*) e histona H3 (*HIS3*). As reações em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) foram preparadas em microtubos de 0,2 mL contendo 10 ng de DNA, 6,25 µL de MyTaq™ Master Mix (Bioline, EUA), 10 µM de cada *primer* e 4,25 µL de água Milli-Q esterilizada para completar o volume final. A reação de PCR foi conduzida em termociclador (Agilent SureCycler 8800), nas seguintes condições: 1 ciclo para etapa inicial de desnaturação (95°C por 5 min), seguido de 35 ciclos com uma etapa de desnaturação (95 °C por 20 seg.), uma de anelamento (59 °C por 45 seg.), uma de extensão (72 °C por 50 seg.) e uma extensão final (72 °C por 5 min). O mesmo foi realizado para amplificação de parte do gene da *HIS3*, utilizando os *primers* H3-1a/ H3-1b (GLASS; DONALDSON, 1995), do gene da *ACT*, com os *primers* ACT-512F/ACT-783R (CARBONE; M.KOHN, 1999), e do gene do *EF1α*, com os *primers* EF1-728F/EF1-986R (CARBONE; M.KOHN, 1999) (Tabela 2). Os produtos das reações de

PCR foram visualizados por meio da eletroforese em gel de agarose a 1% na presença de brometo de etídio ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), U.V. a 254 nm e marcador molecular padrão *Low DNA Mass Ladder*<sup>®</sup> (Invitrogen).

**Tabela 2.** Sequências dos *primers* utilizados na amplificação do DNA para a identificação molecular de *P. musae* e o tamanho esperado do *amplicon*.

Primers	Sequência dos primers (5'-3')	Amplicon	Temperatura de anelamento
ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGCTGC	600	
ITS 5	TCAGCTTGAATGCTAATGTG		
ACT-512F	ATGTGCAAGCCGGTTTCGC	300	58
ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT		
H3-1a	ACTAAGCAGACCGCCCGCAGG	350	52
H3-1b	GCGGGCGAGCTGGATGTCCTT		
EF1-728F	CATCGAAGTTCGAGAAGG	800	62
EF1-986R	TACTTTGAAGGAACCCTTACC		

Os *amplicons* resultantes foram tratados com o reagente *Exo-SAP* (USB, Affymetrix, EUA), conforme as instruções do fabricante. Subsequentemente, foi realizado o protocolo de sequenciamento das amostras purificadas utilizando o sequenciador automático ABI 3130xl (Applied Biosystem, EUA). Para a identificação molecular dos isolados, a sequência consenso de cada região genômica alvo foi montada com o auxílio do programa Geneious 8.1, e comparada via BLASTN (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1997) contra o banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

#### 5.4 Preparo do inóculo para o bioensaio

O inóculo de *P. musae*, foi preparado a partir do isolado 15EB, uma vez que o mesmo apresentou maior capacidade de esporulação em relação aos outros 5 isolados. Para o inóculo, foi utilizada uma suspensão de conidiósporos de uma cultura jovem do patógeno. O micélio do fungo (15EB) foi macerado com água destilada esterilizada, e 300  $\mu\text{L}$  desta suspensão foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura V8, com auxílio de alça de Drigalski. As placas inoculadas foram mantidas sob temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12h (figura 9) durante 10 dias. A partir da cultura jovem do patógeno, a suspensão de esporos foi preparada com a adição de Tween 20 a 0,05% em cada placa, com os esporos sendo liberados com auxílio

de um escalpelo. A suspensão final obtida foi filtrada em peneira de malha fina e sua concentração foi ajustada para  $1,7 \times 10^4$  conídios/mL, os conídios foram contados utilizando câmara de Neubauer.

### 5.5 Bioensaio para sequenciamento de pequenos RNAs de *M. acuminata*- *P. musae*

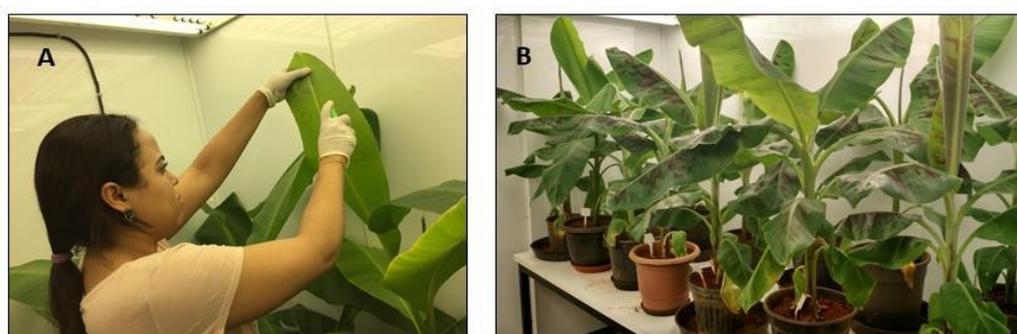
Foram utilizadas plantas de *M. acuminata* cv. Cavendish Grande Naine (CAV)-genótipo suscetível a *P. musae*, e de *M. acuminata* ssp. *burmannica* Calcutta 4 (C4) - genótipo resistente. Todas foram fornecidas pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMPF), provenientes de cultivo *in vitro*. As cultivares foram transplantadas em vasos metálicos de 24x20cm previamente lavados e desinfestados, preenchidos com substrato esterilizado, composto por partes iguais de solo, areia, húmus de minhoca e esterco de galinha. Anteriormente à realização dos bioensaios, as mudas passaram por um período de aclimação de 7 dias em fitotron a 25°C, fotoperíodo de 12h e umidade relativa de, no mínimo, 80%.



**Figura 9.** Resumo das etapas envolvidas na multiplicação de *P. musae* para produção de inóculo (A-F). Preparação de um macerado a partir de colônias do fungo (A e B); Adição de água e maceração (C e D); Aplicação do macerado sobre o meio V8 e o espalhamento com alça de Drigalski (E e F) (Pinheiro et al., 2022).

O bioensaio, conduzido na Estação Experimental de Biologia da UnB, foi composto por 16 plantas dos genótipos Calcutta 4 e 16 plantas Cavendish Grande Naine, ambos inoculados com *P. musae* e não inoculados (controles). Nas duas folhas mais jovens e totalmente expandidas, foram pré-delimitadas áreas de 2,5 x 2,5cm<sup>2</sup> por folha, onde foi realizada a inoculação com 200 µL de uma suspensão na concentração 1,7 × 10<sup>4</sup> conídios/mL preparada com Tween 20 a 0,05% com auxílio de um borrifador.

No total foram inoculadas oito plantas de de Calcutta 4 e oito Cavendish Grande Naine. A outra metade, oito plantas de Calcutta 4 e oito plantas de Cavendish foram usadas como controle, inoculadas apenas com Tween 20 a 0,05%. As plantas foram distribuídas aleatoriamente e mantidas no fitotron sob um fotoperíodo de 12-h luz/12-h escuro a 25 °C e umidade relativa de no mínimo 85% (Figura 10). Foram definidos dois pontos de coleta (*timepoint*) do material foliar: 3 (início da infecção) e 12 (fase tadia da infecção) dias após a inoculação (DAI), de acordo com trabalho de (CAVALCANTE et al., 2011). Para cada tempo de coleta (3 DAI e 12 DAI) analisado, um total de oito plantas de cada genótipo foram utilizados, quatro inoculadas e quatro controles, totalizando quatro réplicas biológicas (tabela 3), das quais três foram utilizadas para a realização do sequenciamento. Para a coleta dos pontos definidos, foram recortados os seis fragmentos delimitados por folha, juntando 12 áreas inoculadas por planta. As amostras foram imediatamente transferidas para nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenados a uma temperatura de -80 °C até a extração do RNA total.



**Figura 10.** A- Inoculação na face abaxial da folha de bananeira com *P. musae*. B- Distribuição aleatória das bananeiras no fitotron.

**Tabela 3.** Delineamento experimental para os bioensaios *M. acuminata* - *P. musae*. A tabela mostra o número de plantas utilizadas em cada condição.

	3 DAI		12 DAI	
	Inoculado	Não inoculado	Inoculado	Não inoculado
<i>M. acuminata</i> Calcutta 4	4	4	4	4
<b>Total de plantas</b>	8		8	

DAI= Dias após a inoculação

### 5.6 Extração e purificação do RNA total de *M. acuminata*

Para a extração do RNA total, foram selecionadas três áreas foliares por amostra. O RNA total foi extraído de cada fragmento foliar utilizando-se o reagente *Plant RNA Purification Reagent* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, o RNA isolado foi purificado com o kit *ReliaPrep™ miRNA Cell and Tissue Miniprep System* (Promega®, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. Para eliminar possíveis contaminações com DNA genômico, o RNA total foi submetido ao tratamento com DNase I (New England BioLabs, UK), a 37°C por 20 min, seguida de desnaturação a 75°C por 10 min para inativar a enzima. A integridade e a quantificação do RNA total extraído foram analisadas por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% e por espectrofotometria utilizando um *NanoDrop® Lite* ((ND-1000 UV-Vis - Thermo Scientific, EUA).

### 5.7 Sequenciamento de pequenos RNAs em plataforma Illumina

Foi realizado o sequenciamento de pequenos RNAs utilizando a tecnologia de sequenciamento por síntese em plataforma Illumina, a partir do RNA total extraído de folhas de *M. acuminata* Calcutta 4. Para o sequenciamento dos sRNAs, foram utilizadas três amostras de cada tratamento (3 e 12 DAI) do genótipo resistente Calcutta 4 inoculadas (tratamento) e não inoculadas (controle) com o patógeno *P. musae*, totalizando 12 bibliotecas construídas a partir do RNA total (Tabela 4). O sequenciamento foi realizado pela *McGill University and Génome Québec Innovation Centre* – Canadá. As amostras foram enviadas em tubos RNASTable (Biomatrix, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Para garantir a qualidade das amostras após o envio, a integridade do RNA foi avaliada por meio do sistema do *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, EUA). A construção das bibliotecas foi realizada utilizando o NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Kit for Illumina e o

sequenciamento foi realizado por meio da tecnologia Illumina HiSeq 2500 SR50. O sequenciamento *single-read* (50 pares de bases), foi conduzido usando TruSeq RNA Chemistry v3 (Illumina, EUA).

**Tabela 4.** Delineamento das amostras selecionadas para sequenciamento de pequenos RNAs de *M. acuminata* ssp. burmannicoides Calcutta 4, após interação com *P. musae*.

DAI	<i>Musa acuminata</i> var. Calcutta 4		Total de plantas
	Inoculado	Não inoculado	
3	3	3	6
12	3	3	6
<b>Total de amostras sequenciadas</b>			<b>12</b>

DAI = dias após a infecção

### 5.8 Análise das sequências de pequenos RNAs

As sequências brutas obtidas a partir do sequenciamento passaram por uma avaliação de qualidade por meio do programa CUTADAPT (<http://journal.embnet.org/index.php/embnetjournal/article/view/200>) (MARTIN, 2011), com os adaptadores da região 3' removidos. Apenas as sequências de 20 a 24 nucleotídeos de tamanho foram utilizadas. O programa RFam foi também utilizado para eliminar sequências de outros tipos de RNAs, principalmente o RNA ribossomal (rRNA) (<https://rfam.xfam.org/>) (KALVARI et al., 2018).

### 5.9 Identificação de miRNAs de *Musa*

As sequências com alta qualidade foram alinhadas ao genoma de referência de *M. acuminata* DH-Pahang v.2 (disponível na plataforma Banana Genome HUB (<https://banana-genome-hub.southgreen.fr/organism/Musa/acuminata>)) (D'HONT et al. 2012) utilizando o programa Bowtie V.1.2.2 (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>). Os programas *Shortstack* (<https://github.com/MikeAxtell/ShortStack>) (AXTELL, 2013) e *miReap* ([https://tools4mirs.org/software/sequencing\\_analysis/mireap/](https://tools4mirs.org/software/sequencing_analysis/mireap/)) foram usados para predição de miRNAs. O programa *Shortstack*, associado ao mireap realiza uma análise dos critérios necessários para a anotação de miRNA presentes em planta. Os critérios usados pelos softwares são: (a) precursor menor que 300nt, (b) um único duplex miRNA:miRNA\*, (c) ausência de *stems* secundários ou grandes loops interrompendo o duplex, (d) expressão confirmada por sRNA-Seq, (e) replicação do resultado (presente em pelo menos duas bibliotecas), (f) Precisão de pelo menos 75% (soma das sequências do miRNA, miRNA\* e suas respectivas variações de

até um nucleotídeo dividido pelo total de sequências alinhadas no loco, (g) tamanho do miRNA de 21 nt. Com base em todos esses critérios, o programa classifica cada sequência em Y (sim), quando atende a todos os requisitos, N15, quando atende todos os requisitos, porém o miRNA\* está ausente, e N1-N14 quando algum dos critérios não foi atendido. Neste trabalho, foram considerados miRNAs potenciais aqueles que receberam a classificação Y ou N15, e estes seguiram para a curadoria manual.

Os miRNAs conservados foram identificados após o alinhamento das sequências obtidas contra o banco de dados *mirBase* V.22.1. Foram considerados miRNAs conservados aqueles que obtiveram *e-value* abaixo de  $1e^{-4}$  e possuem tamanho entre 20 e 22 nt. Aqueles que não tiveram similaridade com sequências já conhecidas foram anotados como novos miRNAs.

### 5.10 Análise da expressão diferencial de miRNAs

O programa *Shortstack*, além de analisar os critérios para a anotação dos miRNAs, gera um arquivo com as contagens brutas das sequências de cada miRNA por amostra. Esse arquivo foi usado para a análise da expressão diferencial de miRNAs nas amostras inoculadas para cada ponto de coleta, em comparação com as respectivas amostras controle. O programa edgeR (MCCARTHY; CHEN; SMYTH, 2012) foi usado para normalizar as contagens de acordo com o tamanho das bibliotecas.

Cada miRNA foi analisado quanto à sua expressão diferencial dos tratamentos inoculados (3DAI\_I e 12DAI\_I), em comparação com os respectivos controles não inoculados (3DAI\_NI, 12DAI\_NI). Para a realização da análise dos genes diferencialmente expressos (DEGs) dos miRNAs e com significância estatística, entre os tratamentos inoculado e não inoculado, os parâmetros utilizados foram o valor de p ajustado por FDR (padj, FDR) de 0,05 e utilizando o método Benjamini-HochBergh, e o valor da razão entre tratamentos na base logarítmica de 2 ( $\log_2 \text{Fold Change} - \log_2 \text{FC}$ ).

### 5.11 Predição de potenciais alvos do miRNAs

Os transcritos potencialmente modulados pelos miRNAs selecionados foram preditos pelo programa *TargetFinder* (<https://academic.oup.com/bioinformatics/article/21/8/1401/250353>) (XIAOCHEN; WANG, 2005). As sequências de miRNAs foram alinhadas contra dados de RNAseq da interação *M. acuminata* Calcutta 4 x *P. musae* de trabalhos anteriores (PINHEIRO, 2022). O programa penaliza cada alinhamento entre o miRNA e o transcrito de acordo com as seguintes métricas: (a) *mismatches*, *gap* ou *bulge* de nucleotídeo único: 1 ponto, (b) pares de base G:U: 0,5 ponto,

(c) Se essas métricas ocorrem entre as bases 2-13 relativo ao sentido 5' do miRNA, as penalidades são dobradas, (d) os alinhamentos são rejeitados caso apresente mais que um *gap* ou *bulge* de nucleotídeo único, mais que sete eventos de *mismatches*, pareamento G:U, *bulges* e *gaps* ou se apresentar, pelo menos, quatro *mismatches* ou quatro pareamentos G:U. O programa tem como padrão excluir os alinhamentos que apresentarem *score* acima de 4 pontos. A partir dos resultados do *TargetFinder*, foram selecionados até cinco genes-alvo preditos por miRNA, para garantir uma análise detalhada dos potenciais alvos.

### 5.12 Análise de ontologia gênica (GO) dos alvos preditos

Os termos de ontologia gênica de processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares dos transcritos potencialmente modulados pelos miRNAs foram anotados através do programa *InterproScan* V.5.46-81.0 (ZDOBNOV; APWEILER, 2001).

### 5.13 Síntese de cDNA do miRNAs

Os miRNAs foram isolados de tecidos de folhas de *Musa* inoculadas e não inoculadas com *P. musae*, utilizando o reagente *Plant RNA Purification Reagent* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), de acordo as instruções do fabricante. A purificação do RNA isolado foi realizada de acordo com o protocolo do kit *Direct-Zol™ RNA Miniprep Plus* (Zymo Research, USA). As amostras foram tratadas com DNase I, do próprio kit, para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico remanescente nas amostras. A integridade e quantificação foram avaliadas por meio de eletroforese em gel de agarose a 4%, e espectrofotômetro *NanoDrop® Lite* ((ND-1000 UV-Vis - Thermo Scientific, EUA).

Para a síntese de cDNA dos miRNAs, foi realizada a transcrição reversa utilizando o método de *Stem-loop pulsed* PCR de acordo com o protocolo adaptado de Varkonyi-Gasic *et al.* (2007). O método foi realizado da seguinte forma: 2 µg de RNA, 1 µL de mix dNTP (10mM), 1 µL de Oligo dT (500 ng/µL). As amostras foram então aquecidas a 65 °C por 5 min e colocadas em gelo por 2 min, logo após foram centrifugadas brevemente após isso, os seguintes reagentes do kit *SuperScript IV* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) foram adicionados: 4 µL de tampão da transcriptase reversa (5X), 2 µL de DTT (0,1 M), 0.1 µL de RNase OUT (40 U/µL), 0,5 µL da enzima transcriptase reversa *SuperScript IV RT* (200 units/µL) 0,4 µL de água esterilizada e foi adicionado 1 µL do pool de *stem loop* RT primer (1 µM) totalizando 20 µL de reação. Em seguida, as amostras foram centrifugadas brevemente e incubadas em termociclador a 16 °C por 30 min. Foi realizado uma *Pulsed* RT-PCR da seguinte forma: 60 ciclos a 30 °C por 30 s, 42 °C for 30 s e 50 °C por 1 s. As amostras foram

então incubadas a 85 °C por 5 min para inativar a enzima transcriptase reversa. Para verificar a eficiência da síntese do cDNA dos miRNAs, foi realizado uma RT-PCR.

#### 5.14 Síntese de cDNA para os genes alvos de *Musa*

Para a síntese de cDNA de *M. acuminata* var. Calcutta 4, as amostras foram preparadas para cada condição experimental a partir do RNA total de cada uma das três réplicas biológicas. O RNA total (2 µg) foi transcrito reversamente para cDNA usando os *primers Super Script IV RT* e Oligo (dT) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

#### 5.15 Validação da expressão dos miRNAs e dos genes alvos de *Musa* via RT-qPCR

As validações via RT-qPCR foram conduzidas de acordo com Varkonyi-Gasic et al. (2007). Os cDNAs foram sintetizados com kit *SuperScript™ IV* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) conforme descrito nos tópicos 5.13 e 5.14. Os experimentos de RT-qPCR foram conduzidos de acordo com Varkonyi-Gasic (2007). As reações foram preparadas usando *iTaq™ Universal SYBR® Green* (Bio-Rad, CA, EUA), e as amplificações realizadas no termociclador ABI StepOne® Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Um total de três réplicas experimentais independentes e três réplicas técnicas por amplificação foram incluídas. Os genes ubiquitina 2 (*UBQ2*) e *GTP-binding nuclear protein (RAN)* foram utilizados como genes de referências para a normalização dos genes alvos e dos miRNAs de *M. acuminata* var. Calcutta de acordo com REGO et al. (2019).

Todas as sequências de *primers* empregadas na quantificação da expressão gênica de miRNAs e genes alvos estão listadas na Tabela 5 e Tabela 6. Os níveis relativos de expressão dos genes foram quantificados pelo método comparativo  $\Delta\Delta Ct$  (RAO et al., 2013). As reações de qPCR continham 2 µL de uma diluição de 1:20 do cDNA estoque, 0,2 µL de cada primer *forward* e *reverse* (10 mM), 5 µL *iTaq™ universal SYBR® Green* (Bio-Rad, CA, EUA) e ajuste com água livre de ribonuclease para um volume final de 10 µL. As amplificações foram conduzidas usando uma etapa inicial de 52 °C por 2 min e 95 °C por 10 min, seguido por um total de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s, depois anelamento do *primer* e extensão a 60 °C por 60 s. A especificidade dos *primers* foi determinada usando o *software* SDS 2.2.2 (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e para a verificação dos produtos amplificados, a curva de desnaturação -“melting curve” foi analisada após o término da amplificação. O programa foi 95°C por 15 s, 60°C por 60 s, aumentando 0,3°C a cada ciclo até atingir 95°C.. Os dados brutos de  $\Delta Rn$  foram analisados usando *LinRegPCR*, versão 2017.1. A fluorescência da linha de base foi corrigida pela reconstrução da fase log-linear, com dados usados para determinar a eficiência

média de RT-qPCR de cada gene. Posteriormente, o software *Biogazelle qBasePlus* (Informer Technologies, Inc.) foi utilizado para calcular os ciclos médios de quantificação (Cqs) por gene e o software *GraphPad Prism v7* para análise estatística.

**Tabela 5.** Sequência dos *stem loop primers* usados na síntese de cDNA dos miRNAs e sequência dos primers específicos para quantificação relativa de cada miRNA.

Musa mi	Primer	Sequências dos primers (5'-3')	Amplicon size (pb)
miR397a-5f	Stem-loop RT	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAC TCAT	80 pb
	Forward	GTTGTTGAGTGCAGCGTTG	
	Universal reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT	
miR167a-3f	Stem-loop RT	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACACTCAGAT	80 pb
	Forward	GTTTGAAGCTGCCAGCATG	
	Universal reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT	
miR393b-3f	Stem-loop RT	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGCCAACGATC	80 pb
	Forward	GTTGTCCAAACGGATCCA	
	Universal reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT	
miR171a-3f	Stem-loop RT	TGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACGATA	80 pb
	Forward	GTTTTGATTGAGCCGTGCC	
	Universal reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT	
miR171e-3f	Stem-loop RT	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACAGAGAT	80 pb
	Forward	GTTGTTGAGCCCGTCAAT	
	Universal reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT	
miR535d-5f	Stem-loop RT	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACGCGTGC	80 pb
	Forward	GTGGTGACAACGAGAGAGA	
	Universal reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT	
miR156b-5f	Stem-loop RT	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAC GTGCTC	80 pb
	Forward	GTTGGTGACAGGAGAGAGT	
	Universal reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT	
miR167b-3f	Stem-loop RT	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAC TCAGAT	80 pb
	Forward	GTGTAAGCTGCCAGCATG	
	Universal reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT	
miR167a-5f	Stem-loop RT	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACACTCAGAT	80 pb
	Forward	GTTTCAAGCTGCCAGCATG	
	Universal reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT	
miR164c-5f	Stem-loop RT	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAC ACACGT	80 pb
	Forward	TGGTGGAGAAGCAGGGC	
	Universal reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT	

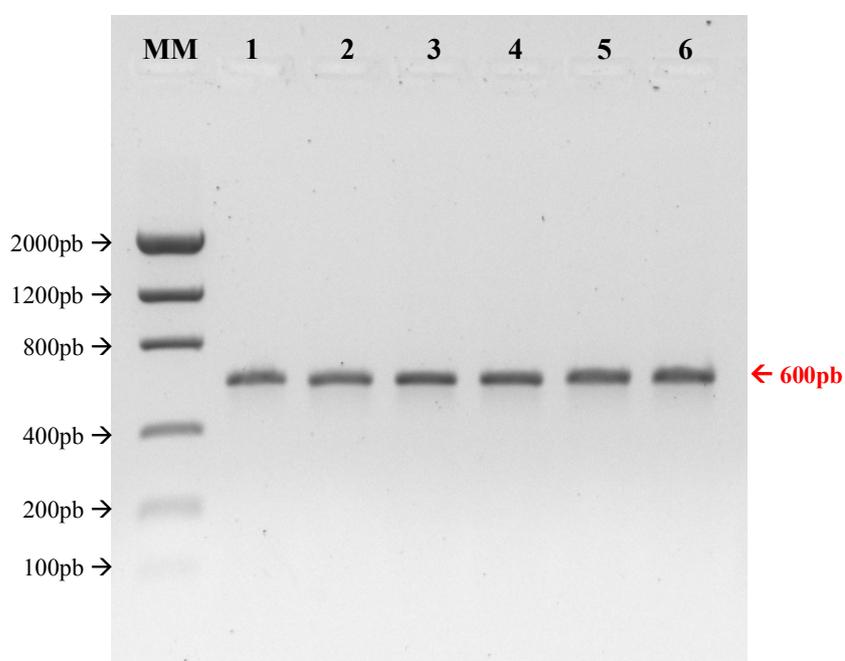
**Tabela 6.** Sequência dos *primers* dos genes alvo de miRNAs em *Musa*.

Target reference				
<i>Musa acuminata</i>	Predicted gene function	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Amplicon size (bp)
DH Pahang				
Gene ID				
Ma03_g12850	pentatricopeptide repeat-contain protein-like	TACTGGGTGTTGCTGTCTA/	CCAACCTCAACCCAGCTAAA	120 pb
Ma04_g10650	Acireductone dioxygenase	GACACAAGCAGAGTGTCTT	TGGTCCTCATCACTCTCATCTA	102 pb
Ma06_g18000	transport inhibitor response 1-like protein	TGTTTGTGGCAACTGCTA1	CTTGACGCTCAGCGAATTTATC	96 pb
Ma06_g38750	scarecrow-like protein 6	GACACAAGCAGAGTGTCTT	AGAGGGAAAGGGATGTTTGG	100 pb
Ma08_g07960	30S ribosomal protein S17	TAGCAGCAGCATCAGTTCT	GAGGAGAGTTGGAGGAAAGAAG	92 pb
Ma09_g28300	squamosa promoter-binding-like protein 14	GTCTCTTACTCTCTCCAA	GCAGCTCTCTACAGCTTATC	89 pb
Ma11_g01530	auxin response factor 12-like	CAGACACATTCCAGGTTCT	GAAGTCCGGCTTGTCGTAAA	100 pb
Ma11_g24070	probable alpha-glucosidase	CACTCTCGATCCCATCAA	CATACTTCTGCCATTCTCGT	105 pb

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Identificação molecular de *P. musae*

A quantidade e a pureza do DNA genômico extraído dos seis isolados foram suficientes para a realização da PCR. Dos seis isolados obtidos, todos apresentaram, na PCR, um único fragmento no tamanho esperado, para a região ITS do rDNA foi de (600 pb) (Figura 11), *ACT* e *HIS* (350 pb) . Após o sequenciamento dos produtos de PCR, a similaridade das sequências obtidas foram verificadas por *BLASTN* em comparação com as sequências disponíveis na base de dados *GenBank*. A análise das quatro regiões genômicas utilizadas confirmaram a identidade de todos os isolados como *P. musae* (Tabela 7).



**Figura 11.** Eletroforese do produto da amplificação da região ITS do rDNA dos seis isolados de *P. musae* coletados na Estação Experimental de Biologia – UnB, em gel de agarose a 1%. MM - Marcador Molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen); 1 – 018b BA; 2 - 01EB; 3 - 12EB; 4 - 15EB; 5 - 55EB; 6 - 90EB.

**Tabela 7.** Análises das sequências por similaridade via *BLASTN* no Genbank, para as três regiões genômicas analisadas.

Isolado	Região genômica	Identidade	Resultado
01 EB	ITS 5-4	99,6%	<i>Mycosphaerella musicola</i>
	Actina	94,7%	<i>Mycosphaerella musicola</i>
	Histona	98,9%	<i>Mycosphaerella musicola</i>
12 EB	ITS 5-4	98,3%	<i>Mycosphaerella musicola</i>
	Actina	71,5%	<i>Mycosphaerella musicola</i>
	Histona	99,7%	<i>Mycosphaerella musicola</i>
15 EB	ITS 5-4	98,6%	<i>Mycosphaerella musicola</i>
	Actina	99,6%	<i>Mycosphaerella musicola</i>
	Histona	99,0%	<i>Mycosphaerella musicola</i>
018 b BA	ITS 5-4	99,0%	<i>Mycosphaerella musicola</i>
	Actina	99,0%	<i>Mycosphaerella musicola</i>
	Histona	98,0%	<i>Mycosphaerella musicola</i>
55 EB	ITS 5-4	93,2%	<i>Mycosphaerella musicola</i>
	Actina	97,3%	<i>Mycosphaerella musicola</i>
	Histona	99,0%	<i>Mycosphaerella musicola</i>
90 EB	ITS 5-4	98,0%	<i>Mycosphaerella musicola</i>
	Actina	94,0%	<i>Mycosphaerella musicola</i>
	Histona	99,0%	<i>Mycosphaerella musicola</i>

(Teleomorfo: *Mycosphaerella musicola*)

## 6.2 Extração e purificação do RNA total para o sequenciamento dos miRNAs

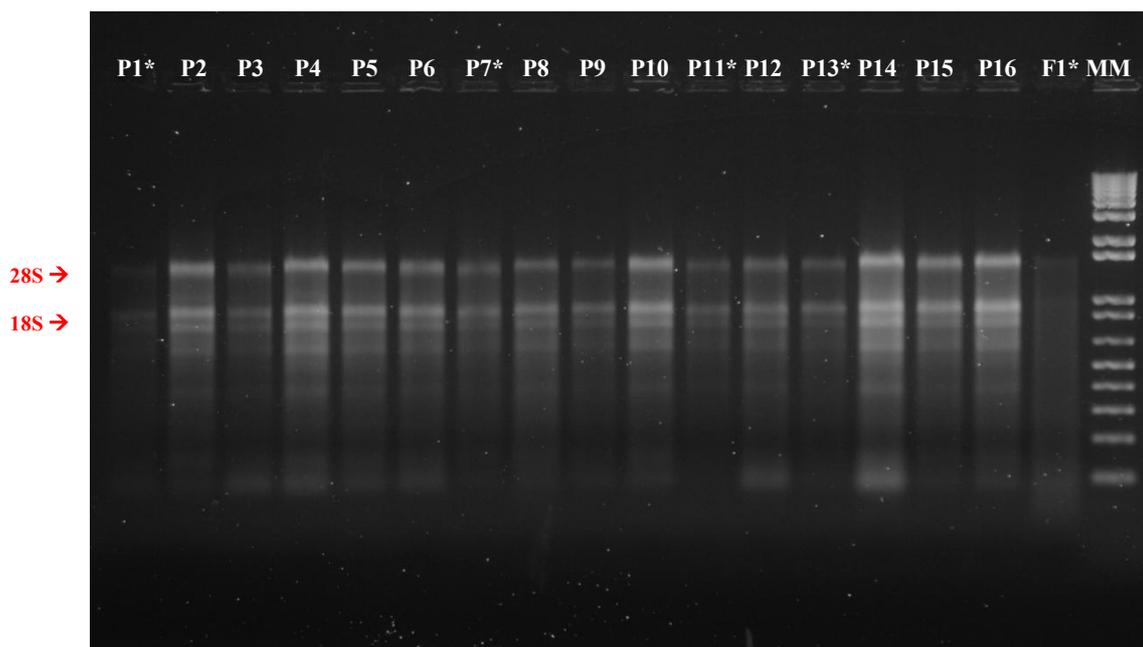
O RNA total das amostras foliares de *M. acuminata* Calcutta 4, que foram extraídas pelo reagente *Plant RNA Purification Reagent* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), e purificadas com *ReliaPrep™*, apresentaram quantidade e qualidade dentro dos padrões solicitados para sequenciamento. As concentrações de RNA obtidas após a purificação apresentaram rendimento médio de 385,5 ng/μL após passarem pela coluna de purificação e apresentaram valores de absorbância ( $A_{260/280}$ ) entre a 2,09 e 2,14 (Tabela 8). A quantidade e pureza dos RNAs totais foi estimada por análise da absorbância a 260 nm, utilizando como padrão 1 unidade  $A_{260}=40 \mu\text{g}$  de RNA, por meio de espectrofotômetro *NanoDrop® Lite* ((ND-1000 UV-Vis - Thermo Scientific, EUA)., que pela razão  $A_{260}/A_{280}$ , indica possíveis contaminações de RNA com proteínas. Baseado na lei de Beer-Lambert, uma mudança linear na absorbância ocorre com a concentração do ácido nucleico. Uma relação OD 260/280 maior do que 1,8 é considerado um indicador de RNA de alta pureza (FLEIGE e PFAFFL., 2006). A integridade do RNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 12),

indicando que o RNA extraído apresentou alta integridade e sem contaminação com DNA genômico.

**Tabela 8.** Quantificação do RNA total extraído de folhas de *M. acuminata* var. Calcutta 4 inoculadas com *P. musae* e controle não inoculado, em espectrofotômetro *NanoDrop*® *Lite* ((ND-1000 UV-Vis - Thermo Scientific, EUA).

Tratamento	Amostra	Volume final	Conc. (ng/μl)	Razão A 260/280	Razão A 260/230
Inoculado, 3 DAI*	P3	50 μl	435,4	2,11	1,75
Inoculado, 3 DAI	P4	50 μl	551,2	2,09	1,92
Inoculado, 3 DAI	P16	50 μl	508,3	2,11	1,62
Inoculado, 12 DAI	P2	50 μl	450,9	2,12	1,74
Inoculado, 12 DAI	P6	50 μl	282,6	2,12	1,52
Inoculado, 12 DAI	P15	50 μl	271,9	2,13	1,61
Não inoculado, 3 DAI	P8	50 μl	274,6	2,13	1,6
Não inoculado, 3 DAI	P12	50 μl	330,1	2,12	0,96
Não inoculado, 3 DAI	P14	50 μl	609,1	2,09	1,43
Não inoculado, 12 DAI	P5	50 μl	395,4	2,13	1,83
Não inoculado, 12 DAI	P9	50 μl	168,1	2,14	1,05
Não inoculado, 12 DAI	P10	50 μl	348,4	2,12	1,76

\*DAI = dias após inoculação.



**Figura 12.** Resultado da extração final de RNA foliar para o sequenciamento dos miRNAs, em gel de agarose a 1%. O RNA total foi extraído de folhas de *M. acuminata* subsp. *burmanicoides* var. *Calcutta 4* não infectadas e artificialmente desafiadas com conidiósporos do isolado 15EB de *P. musae*. Identificação das amostras conforme tabela 4. \*Amostras não utilizadas para sequenciamento. MM = 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

### 6.3 Predição de miRNAs em *M. acuminata* var. *Calcutta 4*

#### 6.3.1 Análise do sequenciamento de sRNAs

O sequenciamento via Illumina Hiseq 2500 dos miRNAs da interação *M. acuminata* e *P. musae* gerou um total de 255 milhões de sequências brutas (reads), e após a remoção dos contaminantes de RNA, tais como tRNA, rRNA e snRNA e a seleção de somente sequências entre 20 e 24 nt de tamanho, um total de 25,5, 19,5, 23,7 e 23,6 milhões de reads foram mantidas para cada biblioteca 3DAI\_NI, 3DAI\_I, 12DAI\_NI e 12DAI\_I, respectivamente. Para as análises subsequentes, as sequências que apresentaram apenas uma ocorrência dentro das réplicas de cada amostra foram excluídas. Assim, 22,9, 17,8, 21,9 e 21,7 milhões de reads foram identificadas sendo 646.263, 378.890, 452.237, 646.263 sequências únicas em 3DAI\_NI, 3DAI\_I, 12DAI\_NI e 12DAI\_I, respectivamente. Destas, 239.038, 136.706, 161.139 e 148.642 foram mapeadas no genoma de referência DH Pahang – *M. acuminata* ssp. *malaccensis* em 3DAI\_NI, 3DAI\_I, 12DAI\_NI e 12DAI\_I, respectivamente (Tabela 9).

**Tabela 9.** Dados resultantes do sequenciamento de sRNA extraído de folhas de *M. acuminata* var. Calcutta 4 desafiadas ou não com *P. musae*, via Illumina Hiseq 2500.

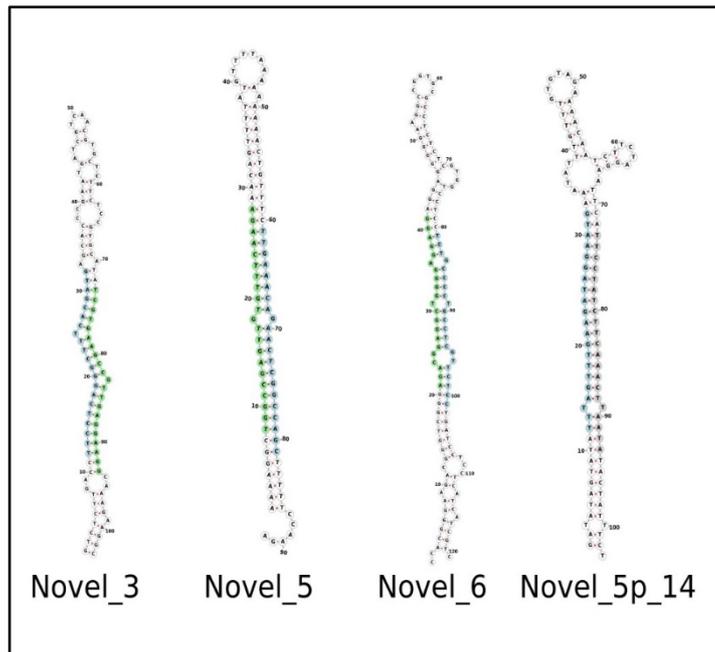
Amostra	seqüências brutas	20-24 pb	Sem contaminantes	Mais do que ocorrência	Seqüências únicas	Mapeadas no genoma
<b>3DAI_NI</b>	77,893,397	32,287208	25,523212	22,888201	646,263	239,038
<b>3DAI_I</b>	52,809507	23,900027	19,558720	17,809613	378,890	136,706
<b>12DAI_NI</b>	61,751590	29,073162	23,722876	21,889326	452,237	161,139
<b>12DAI_I</b>	62,468183	29,035023	23,639788	21,757940	646,263	148,642

DAI = dias após inoculação. I = inoculado. NI= não inoculado

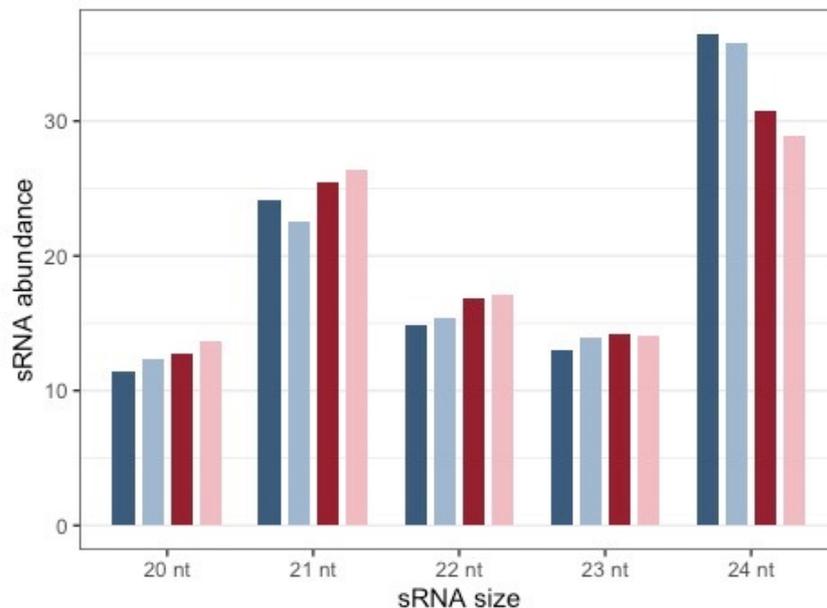
### 6.3.2 Identificação de miRNAs em *M. acuminata*

Um total de 202 loci contendo genes de miRNAs pertencente a 30 famílias diferentes foram identificados. Destes, 166 miRNAs estão completos nos dados de sequenciamento, ou seja, com o duplex miRNA:miRNA\* identificados e 36 miRNAs foram identificados apenas pela seqüência do miRNA maduro (Anexo 1-Tabela suplementar 1). Um total de 24 novos miRNAs também foram identificados, sendo 9 completos e 15 contendo apenas a seqüência do miRNA maduro (Anexo 1- Tabela suplementar 2). A Figura 13 mostra 4 exemplos da estrutura dos novos miRNAs identificados em *M. acuminata* var. Calcutta 4. As estruturas em *hairpin* para todo o conjunto dos novos miRNAs podem ser encontrados no (Anexo 1- Figura suplementar 1).

A identificação dos sRNA de *Musa* demonstrou variações de 20 a 24 nt de tamanho, a distribuição dos tamanhos dos sRNA está de acordo com o esperado para amostras de plantas, com dois picos nos tamanhos 21 e 24 nt (Figura 14).

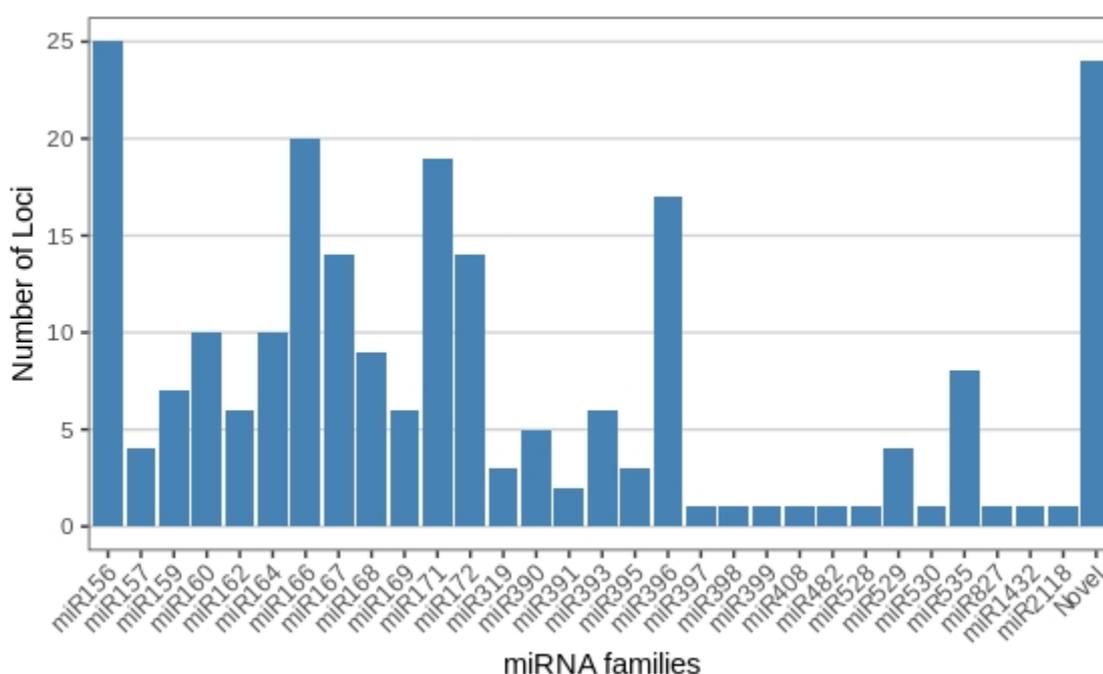


**Figura 13.** Visualização da estrutura secundária de 4 novos miRNAs que foram identificados em *M. acuminata* var. Calcutta 4. As estruturas secundárias dos miRNAs foram determinadas utilizando o software Forna (<http://rna.tbi.univie.ac.at/forna/>). As sequências destacadas em verde representam as sequências star, em azul as sequências do miRNA maduro e em cinza a sequência de uma possível sequência star (N15).



**Figura 14.** Distribuição dos tamanhos e abundância dos pequenos RNAs de *M. acuminata* var. Calcutta 4. Barras em azuis: 3DAI; Barras em vermelho 12DAI; barras escuras: amostras não inoculadas e barras claras: amostras inoculadas.

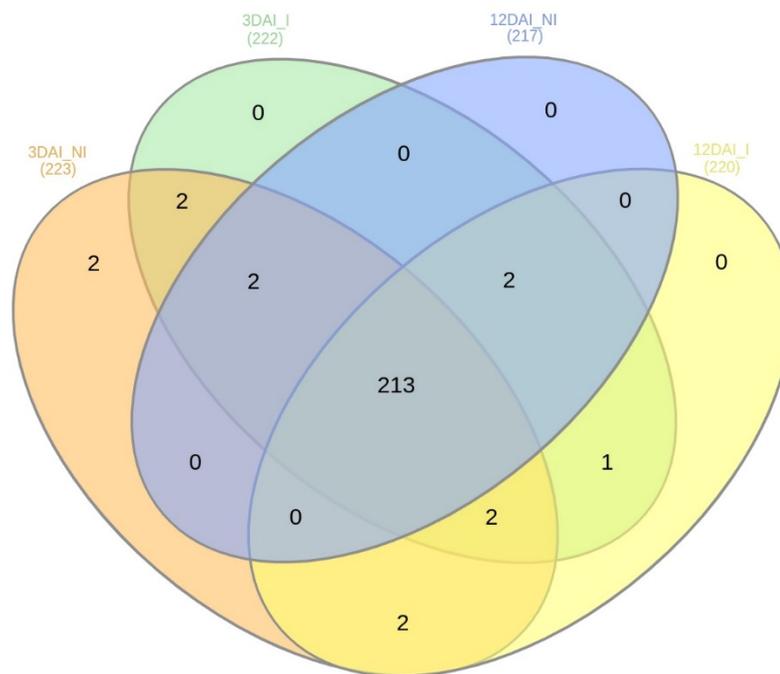
A identificação dos miRNAs de *M. acuminata* var. Calcutta 4, que estão potencialmente envolvidos em respostas imunes a *P. musae*, foi realizada por meio de análises das sequências de pequenos RNAs. Dentre as 30 famílias de miRNAs observadas nesse estudo, o miRNA156 foi o que apresentou o maior número de loci distintos com 25 genes de miRNA identificados, seguido pelo miRNA166 (20 loci), miRNA171 (19 loci), miRNA396 (17 loci). O miRNA167 e o miRNA172 apresentaram 14 loci, o miRNA164 e miR160 (10 loci cada), miR168 (9 loci), miR159 e miR535 (8 loci), miR162, miR169 e miR393 (6 loci cada), miR390 (5 loci cada), miR157 e miR529 (4 loci cada um), miR319 e miR395 (3 loci cada), miR391 (2 loci) (Figura 15). Todas as famílias dos miRNAs restante, juntamente com os novos miRNAs de *Musa*, apresentaram um único membro (Anexo 1- Tabela suplementar 1).



**Figura 15.** Famílias de miRNAs e respectivo número de membros em *M. acuminata* var. Calcutta 4, observadas na biblioteca de pequenos RNAs caracterizados entre os quatro tratamentos experimentais.

Em relação à presença dos miRNAs nas bibliotecas de sRNA, a maioria foi expressa em todos os tratamentos 3DAI\_NI, 3DAI\_I, 12DAI\_NI e 12DAI\_I (Anexo 1- Tabela suplementar 3). A comparação entre 3DAI\_NI e 3DAI\_I evidenciou um total de 221 miRNAs expressos durante ambos os tratamentos, com quatro expressos exclusivamente em 3DAI\_NI (Novel-5p\_16, Novel-3p\_17, Novel-3p\_19 e Novel-3p\_21) e três em 3DAI\_I (Novel-3p\_10, Novel-5p\_12 e Novel -5p\_15). Da mesma forma, em 12DAI, 216 eram comuns a ambos os

tratamentos, cinco expressos exclusivamente em 12DAI\_NI (três membros miR172a-5p, miR168b-5p e miR169l-5p) e três em 12DAI\_I (Novel-5p\_12, miR169-5p e miR169). Em relação aos dois *timepoints*, seis miRNAs foram expressos exclusivamente em 3DAI (Novel-5p\_16, Novel-3p\_21, Novel-3p\_19, Novel-3p\_17, Novel-3p\_20 e Novel-5p\_14). A Figura 16 também resume os números de miRNAs abundantes observados nas bibliotecas de sRNA, cada um com mais de 1.000 contagens de leitura. Os miRNAs totalizaram 226 aos 3DAI e 220 aos 12DAI.



**Figura 16.** Diagrama de Venn mostrando os números de miRNAs identificados em *M. acuminata* var. Calcutta 4, observados nas quatro bibliotecas de sRNA. DAI = dias após inoculação; I= inoculado; NI= não inoculado

### 6.3.3 Análise de expressão diferencial de miRNAs de *M. acuminata* em resposta a *P. musae*

Com o intuito de avaliar a modulação gênica causadas por miRNAs diante da progressão da infecção por *P. musae* durante a interação com *M. acuminata* var. Calcutta 4, foram realizadas análises de perfil de expressão diferencial entre as amostras inoculadas (I) em relação às não inoculadas (NI) em cada tempo. Os miRNAs *M. acuminata* var. Calcutta 4 foram considerados como sendo diferencialmente expressos com base no mapeamento de reads para modelos de genes do genoma de referência (Anexo 1- Figura suplementar 2), seguido de análise usando contagem HTSeq e EdgeR para identificar os miRNAs que apresentaram expressão

diferencial nos conjuntos de dados entre os tempos de coleta, e do tratamento inoculado verso controles não inoculados.

Para a realização da análise de expressão dos miRNAs entre os tratamentos inoculados e não inoculados, os parâmetros utilizados foram o valor de  $p$  ajustado por FDR ( $p_{adj}$ , FDR)  $< 0.05$  que foram considerados diferencialmente expressos. Em 3DAI, um total de oito miRNAs apresentaram expressão diferencial, desses sete foram regulados positivamente entre os tratamentos 3DAI\_I e 3DAI\_NI (miR395a, miR398a, miR397a, miR827, miR408b, miR160b e miR399b), e um foi regulado negativamente (miR530a). Em 12 DAI apenas um miRNA apresentou expressão diferencial (miR395a), com regulação positiva entre os tratamentos inoculados e não inoculados (Anexo 1- Tabela suplementar 4).

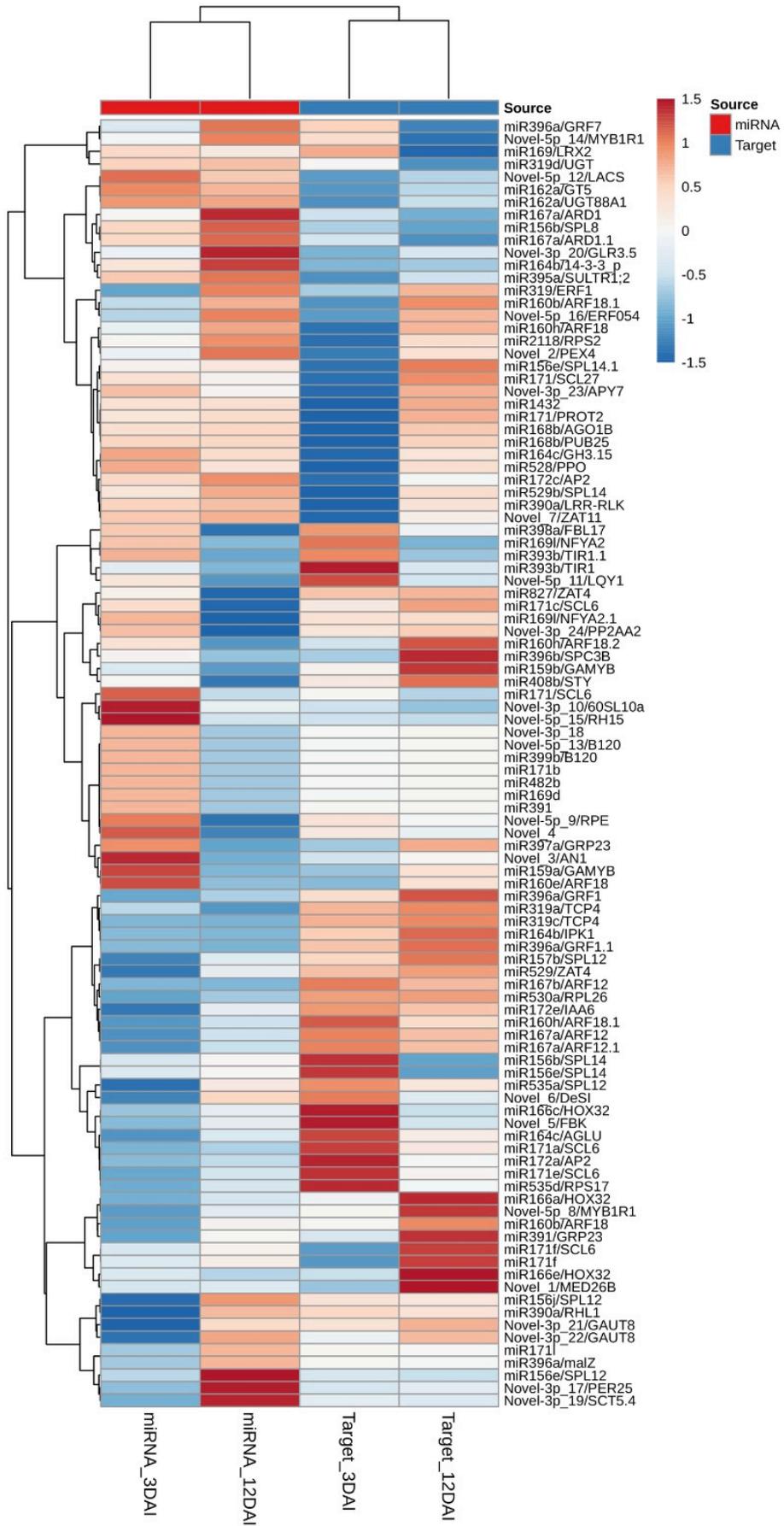
A fim de investigar qualquer potencial modulação de miRNAs durante o curso do tempo (*time course*) da interação planta-patógeno, expressão diferencial entre tratamentos inoculados no 3DAI e 12DAI também foi investigado usando as metodologias acima empregadas para tratamentos inoculados versus tratamentos não inoculados. Curiosamente, 38 miRNAs foram diferencialmente expressos entre os dois pontos de tempo, com regulação positiva ocorrendo para miRNAs aos 12DAI (Anexo 1 – Tabela Suplementar 6).

#### **6.3.4 Heatmap dos genes de miRNAs diferencialmente expressos e seus genes alvos em *M. acuminata* var. Calcutta 4 aos 3 e 12 dias após inoculação com *P. musae***

Uma representação global de todos os perfis de expressão gênica dos miRNAs de *M. acuminata* var. Calcutta 4 durante a interação com *P. musae* é apresentado graficamente em um *heatmap*, evidenciando os padrões de expressão gênica ao longo do tempo. Os dados de expressão, considerando os perfis de expressão significativos ou não significativos foram analisados entre as amostras inoculadas (I) em relação às não inoculadas (NI) em cada tempo (Figura 17). As diferenças nos perfis de expressão dos miRNAs nos conjuntos de dados das amostras não inoculadas foram aparentes entre os dois pontos de coleta estudados, com número semelhante de miRNAs regulados positivamente e negativamente em todo conjunto de miRNAs em cada ponto de coleta.

As análises da expressão dos genes alvos de *M. acuminata* var. Calcutta 4, também estão representados na Figura 17. A modulação da expressão gênica foi conduzida entre os tratamentos inoculados em relação ao tratamento controle não inoculado para cada ponto de coleta, onde os tons de vermelho representam uma expressão gênica positiva (genes superexpressos) e os de azul representam uma expressão negativa (genes reprimidos) em relação ao controle. Pôde-se observar diferenças claras nos perfis de expressão gênica entre os

dois pontos de coleta analisados, conforme observado com os dados de expressão gênica dos miRNAs. Ao comparar o miRNA com o seu gene alvo pôde-se observar uma frequente correlação negativa de expressão entre estes.



**Figura 17.** *Heatmap* dos genes diferencialmente expressos dos miRNAs e seus genes alvos em *Musa acuminata* var. Calcutta 4 aos 3 e 12 dias após inoculação com *P. musae*. As comparações foram avaliadas a partir dos valores de *Log2Fold Change* de cada tratamento. Os valores originais de expressão para os miRNAs e genes-alvo foram normalizados com EdgeR. Expressão gênica positiva foram representadas em vermelho, e expressão gênica negativa foram representadas em azul. Abreviação: DAI, dias após a inoculação.

### **6.3.5 Predição dos genes-alvos e dos novos miRNAs identificados em *Musa acuminata* var. Calcutta 4**

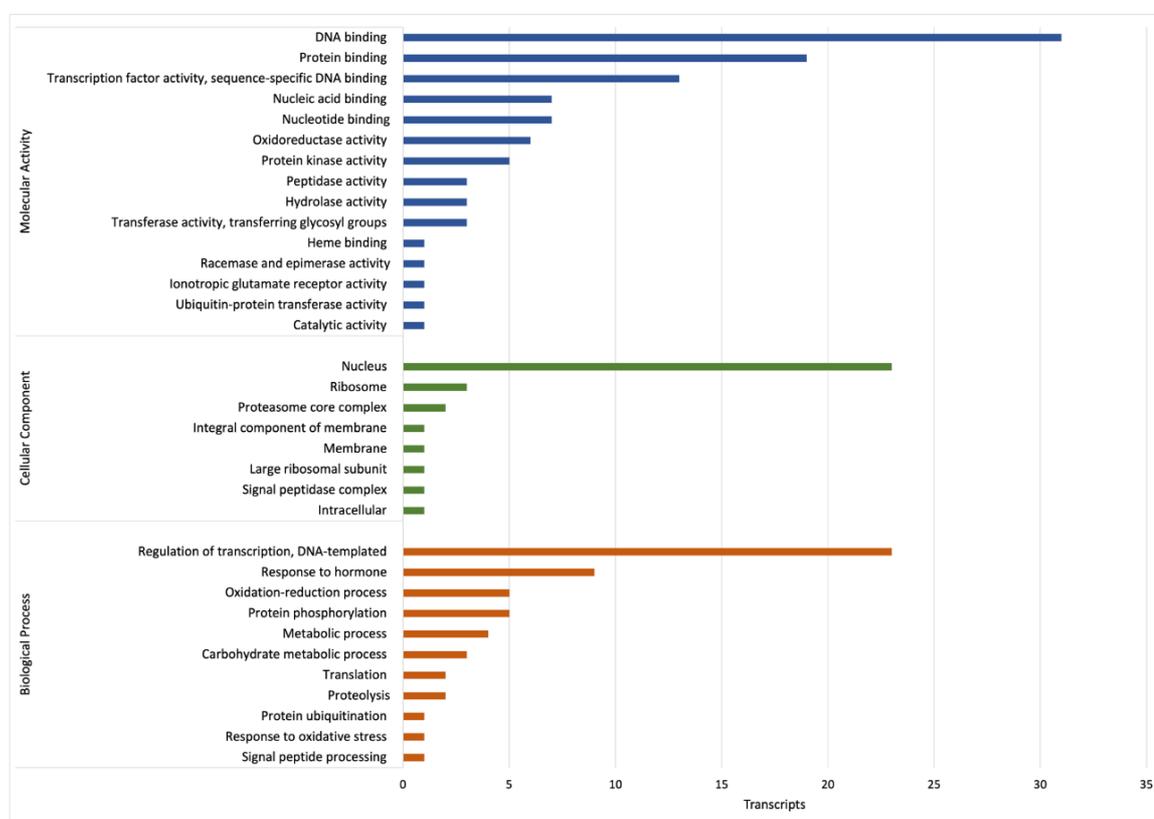
Com base na complementariedade de sequências, a predição dos genes-alvo dos miRNAs maduros foi realizada utilizando o software TargetFinder, onde identificou genes-alvos preditos para maioria dos miRNAs conhecidos e para todos os miRNAs putativos (Anexo 1- Tabelas suplementares 2 e 4). Um gene-alvo era comum entre miR166a-3p e Novel-3p\_18.

No que diz respeito aos novos miRNAs identificados no patossistema *M. acuminata* var Calcutta 4 - *P. musae*, os miRNAs foram expressos em conjunto de cDNA de amostras foliares inoculadas e controles não inoculados durante a resposta da planta a esse patógeno hemibiotrófico. Um conjunto diversificado de genes alvos desses miRNAs foram identificados, estes codificavam para um provável mediador da transcrição de RNA polimerase II subunidade 26b, uma proteína-3 semelhante à *leucine-rich repeated extensin* específica do pólen, um *developmental regulator 1* semelhante ao interferon, uma proteína não caracterizada LOC103993778, uma proteína *F-box/kelch-repeat*, uma *Desumoylating Isopeptidase 2*, uma *X2 transcript variant*, uma *zinc finger protein ZAT11*, três *glucuronosyltransferase 8 proteins*, uma *ribulose phosphate 3-epimerase*, uma *60S ribosomal protein L10a-1*, uma *putative peroxidase-25*, uma proteína *Homeobox-leucine zipper*, uma *subtilisin-like protease SBT5.4* um *glutamate receptor 3.5*, uma provável apirase 7, uma *serine/threonine protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform*, um *long chain acyl-CoA synthetase 4*, uma *G-type lectin*, semelhante ao receptor S, *serine/threonine protein kinase B120*, um *transcription factor MYB1R1-like*, uma proteína *putative disease resistance, RGAI* e um *ethylene-responsive transcription factor*, ERF054.

### **6.3.6 Análise de ontologia gênica (GO) de genes-alvo de miRNAs**

Após a identificação dos genes-alvos e dos miRNAs de *M. acuminata* var. Calcutta 4, foi realizada a ontologia gênica, sendo possível destacar os processos biológicos nos quais esses

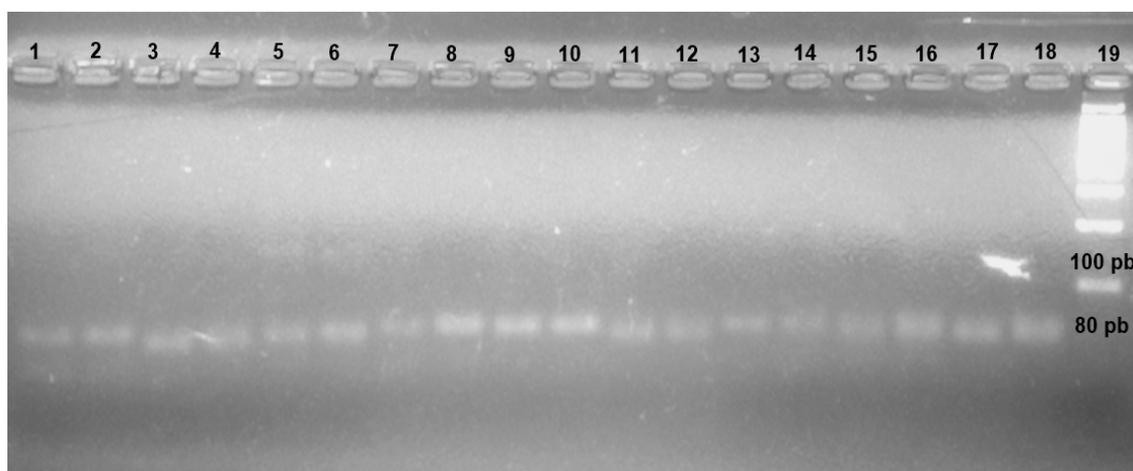
miRNAs estão participando, localização celular esperada e as funções moleculares. Os termos GO foram agrupados em categorias de acordo com sua anotação funcional. A análise de classificação e anotação funcional revelou um total de 8 componentes celulares, 11 processos biológicos e 15 funções moleculares (Figura 18). Ligação ao DNA, ligação a proteína e atividade de fatores de transcrição (atividade molecular), regulação da transcrição, resposta a hormônios e processo de oxidoreductase (processo biológico) e núcleo, ribossomo, complexo do núcleo do proteossoma (componente celular), foram as categorias mais abundantes para os genes alvos de *Musa*. A análise de enriquecimento de ontologia gênica revelou que a maioria dos genes apresentaram funções moleculares relacionados com: respostas de defesa a invasão a patógenos, através de ligação ao ácido nucleico, ligação a nucleotídeos, atividade de oxidoreductase e atividade de proteína quinase. Os processos biológicos relacionados com resposta de defesa incluem, resposta a hormônios, processo de oxidoreductase e resposta ao estresse oxidativo. A ligação ao DNA, a atividade do fator de transcrição, a regulação da transcrição e do núcleo, também fornecem evidências para o envolvimento de numerosos genes alvos do miRNA em *Musa* na regulação da expressão gênica durante as respostas de defesa diante da invasão do patógeno (Figura 18).



**Figura 18.** Distribuição dos termos de GO enriquecidos, nas três categorias principais, para os genes diferencialmente expressos em *M. acuminata* após a interação com *P. musae*

### 6.3.7 Validação da expressão relativa via RT-qPCR dos miRNAs de *M. acuminata* e dos seus genes alvos

Para validar a presença dos miRNAs primeiramente realizou-se uma RT-PCR usando primers específicos de cada um dos 11 miRNAs: miR397a-5p; miR393b-3p; miR171a-3p; miR171e-3p; miR156b-5p; miR167a-3p; miR167b-3p; miR167a-5p; miR167a; miR164c-5p; miR535d-5p. A amplificação por RT-PCR resultou em tamanhos de produtos esperados em 80 pb, confirmando a presença dos miRNAs no RNA sequenciado. Os resultados dessa análise estão apresentados na Figura 19. Dessa forma, pôde-se confirmar a eficiência de síntese a partir de *stem loops* e a presença dos miRNAs.

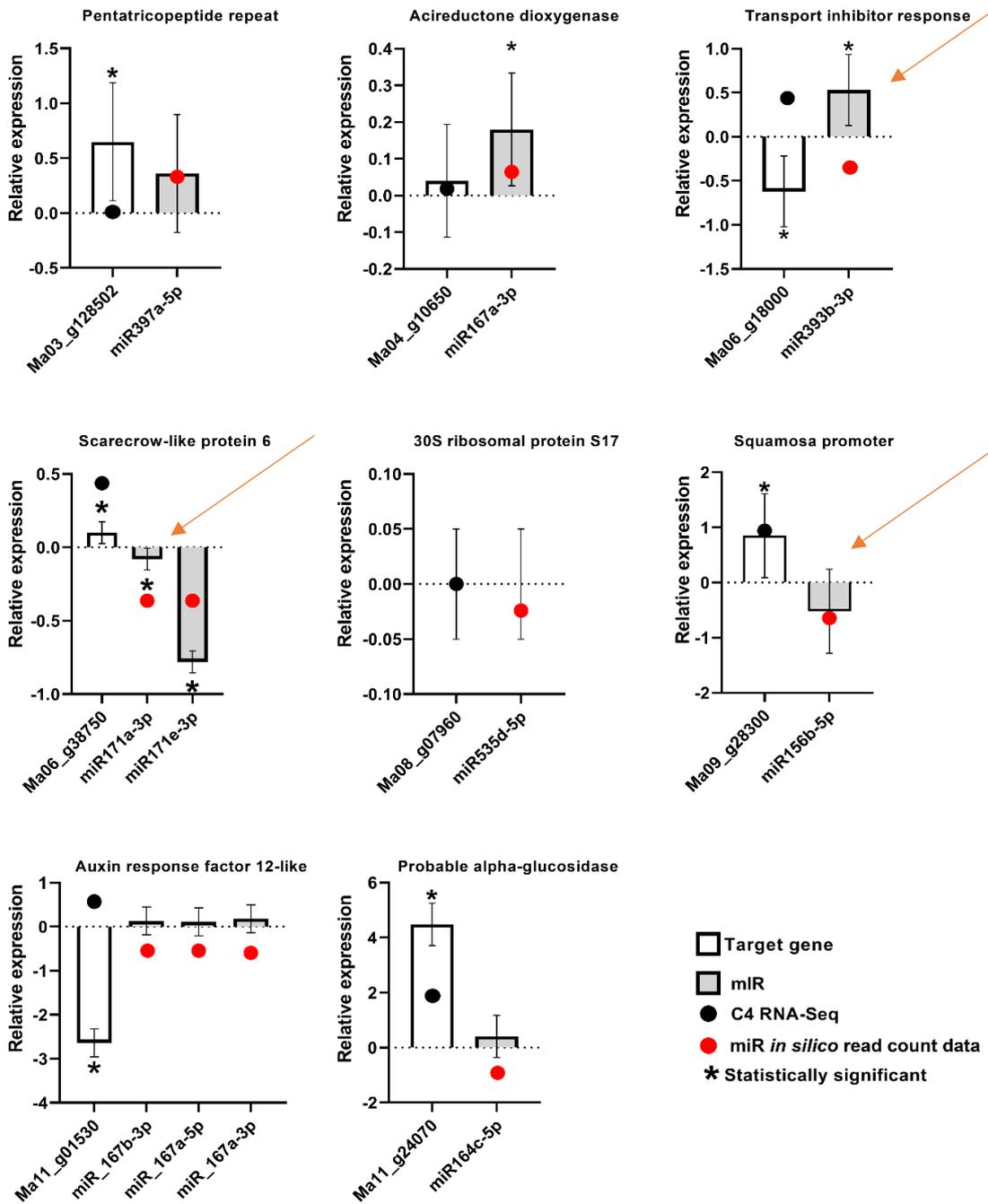


**Figura 19.** Gel de agarose 4 % para visualização dos amplicons, originados via RT-PCR de tamanho esperado para os miRNAs de Musa. 1: miR171a-3p\_I; 2: miR171a-3p\_NI; 3: miR164c-5p\_I; 4: miR164c-5p\_NI; 5: mi171e-3p\_I; 6: mi171e-3p\_NI; 7: miR393b-3p\_I; 8: miR393b-3p\_NI; 9: miR397a-5p\_I; 10: miR397a-5p\_NI; 11: miR167a-3p\_I; 12: miR167a-3p\_NI; 13: miR167b-3p\_I; 14: miR167b-3p\_NI; 15: miR167a-5p\_I; 16: miR167a-5p\_NI; 17: miR535d-5p\_I; 18: miR535d-5p\_NI. 19: Marcador Molecular 100bp *DNA ladder* (Promega).

Um total de 11 miRNAs de sete famílias, juntamente com seus genes alvos preditos foram selecionados a partir da abundância das famílias em relação ao número de loci, e também em relação ao seu gene alvo que está relacionado em respostas de defesa. As combinações de miRNA- gene alvo que foram validadas foram as seguintes: miR397a-5p-Ma03\_g12850; miR393b-3p-Ma06\_g18000; miR171a-3p-Ma06\_g38750; miR171e-3p-Ma06\_g38750; miR156b-5p-Ma09\_g28300; miR167a-3p-Ma09\_g28300; miR167b-3p-Ma11\_g01530;

miR167a-5p-Ma11\_g01530; miR167a-Ma11\_g01530; miR164c-5p-Ma11\_g24070; miR535d-5p-Ma08\_g07960.

Embora a modulação da expressão observada pelo sequenciamento dos pequenos RNAs não tenha indicado expressão diferencial, com base na análise de EdgeR, a validação da expressão relativa, via RT-qPCR, de 8 miRNAs e seus respectivos genes alvos (Figura 20), indicou que de fato o estresse biótico induz a expressão dos miRNAs em *Musa*. Além disso, observou-se uma concordância geral com as tendências de expressão observadas pelo sequenciamento dos pequenos RNAs para a maioria das amostras (Figura 20). Os dados também demonstraram que os miRNAs e os genes alvos apresentaram uma correlação negativa de expressão em 3 casos (mostrados com a seta laranja), casos corroborando com os dados de expressão derivados do sequenciamento.



**Figura 20.** Níveis de expressão relativa via RT-qPCR dos miRNAs selecionados e dos seus genes alvos em *M. acuminata* var. Calcutta 4. Os erros padrão foram calculados com base nos dados após a análise de três réplicas biológicas por tratamento e três réplicas técnicas de amplificação através da RT-qPCR. As análises estatísticas foram realizadas por teste de ANOVA.

## 7. DISCUSSÃO

### Definição de miRNAs

Os miRNAs de plantas são uma classe de moléculas reguladoras endógenas de RNA que realizam o silenciamento gênico pós-transcricional de genes-alvo por meio de clivagem ou repressão da tradução, com funções vitais tanto no desenvolvimento da planta quanto nas interações planta-estresse (SONG et al., 2019).

### Relevância de miRNAs em interações planta-patógeno

A identificação de miRNAs que apresentam expressão diferencial em resposta à infecção por patógenos é o primeiro passo para a elucidação de suas funções na imunidade das plantas. Nesta área em desenvolvimento, numerosos miRNAs de plantas já foram funcionalmente caracterizados em respostas de resistência a doenças (BALDRICH; SAN SEGUNDO, 2016b; LI et al., 2014a; NAVARRO, 2013; RUIZ-FERRER; VOINNET, 2009; SEO et al., 2013b; STAIGER et al., 2013; WEIBERG et al., 2013). Foram realizados também estudos caracterizando miRNAs envolvidos em respostas à seca e estresses salinos (ISRAELI; LAHAV; NAMERI, 1986; LEE et al., 2015; MUTHUSAMY, 2015; PATEL et al., 2019; SURENDAR et al., 2013), assim como em relação às mudanças evolutivas em diferentes subgrupos de *Musa* (GHAG; SHEKHAWAT; GANAPATHI, 2015). Estudos relacionados à resposta ao estresse biótico foram limitados a cultivares que contrastam na resistência a *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (FEI et al., 2019; SONG et al., 2016, 2018).

Nenhum estudo até o momento foi conduzido sobre a expressão de miRNAs no patossistema *M. acuminata* -*P. musae*. Este estudo investigou a expressão dos miRNAs de *M. acuminata* e dos seus genes-alvos, na tentativa de compreender os papéis desses miRNAs reguladores em banana após a invasão pelo patógeno fúngico *P. musae*.

### Resultados Gerais

Na análise do sequenciamento dos miRNAs (sRNA-seq), foram identificados um total de 228 miRNAs conservados pertencentes a 30 famílias miR, oriundos das bibliotecas das amostras inoculadas com *P. musae* e das amostras não inoculadas (controles). Além disso, um total de 24 novos miRNAs foram identificados neste estudo. O número de miRNAs em cada família variou, as famílias de miRNAs miR156, miR166, miR171, miR396, miR167, miR172, miR160 e miR164 abriga a maioria dos membros. Abundância semelhante para as famílias miR156, miR167 e miR396 foi observada, recentemente, em miRNAs de *Arabidopsis*

expressos em resposta a *Phytophthora capsici* (ZHU et al., 2020). Em estudos realizados por Fei et al., (2019) também foi observado a abundância de famílias de miRNAs de *Musa* miR156, miR166, miR167, miR171, miR395 e miR396 durante a interação com *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raça tropical 4.

### **Análise de expressão de miRNAs**

Para cada ponto de coleta, a comparação da expressão de miRNAs foi realizada entre amostras de folhas de plantas inoculadas e controles não inoculados. Em todos os tratamentos, os membros das famílias de miRNAs de *Musa*; miR159, miR166 e miR396 exibiram os níveis de expressão mais altos, consistentes com os trabalhos anteriores em *Musa* (FEI et al., 2019). Em 3DAI, oito miRNAs de diferentes famílias foram diferencialmente expressos de acordo com os dados de sequenciamento obtidos, entre as amostras foliares de plantas inoculadas e controles. No 12DAI, ao contrário, apenas um único miRNA foi identificado como sendo diferencialmente expresso. A análise de expressão gênica via RT-qPCR para os 11 miRNAs conhecidos por estarem envolvidos em respostas de defesa da planta e seus genes alvos, foram conduzidas de acordo com a abundância de membros das famílias de miRNAs. Os dados de expressão gênica via RT-qPCR corroboraram as tendências de expressão dos miRNAs em 3DAI, quando comparados com dados anteriores de RNA-seq para os genes alvos (PINHEIRO et al., 2022).

Diversos miRNAs são altamente conservados em várias espécies de plantas, e podem clivar genes-alvos idênticos ou semelhantes (SONG et al., 2019). Assim, os miRNAs funcionam como repressores gênicos, havendo uma correlação negativa de expressão entre os miRNAs e seus genes- alvos. Os dados aqui também revelaram modulação positiva ou negativa de miRNAs e uma expressão inversamente proporcional entre os miRNAs e seus genes- alvos.

### **Genes alvo em *Musa***

Neste estudo, foi caracterizado várias famílias abundantes de miRNA envolvidas em respostas imune da planta e seus genes-alvo durante a interação *M. acuminata* var. Calcutta 4 – *P. musae*. Essas famílias de miRNA serão discutidas a seguir;

#### **miRNA156**

O miR156 é uma família de miRNA de planta conservada e que tem como alvo vários membros da família de genes semelhantes à proteína de ligação ao promotor Squamosa (*SPL*). Esses genes alvo, estão associados à regulação das mudanças da fase de crescimento da planta,

floração, fertilidade, produção de metabólitos secundários e respostas de JA. Diversos estudos já relataram a presença de miR156 em várias espécies de plantas (CHUCK et al., 2007; WANG et al., 2011; WU et al., 2009; WU; POETHIG, 2006b; XIE et al., 2012; ZHENG et al., 2019). Alguns estudos já relataram a modulação positiva e negativa da expressão gênica de miR156 em diversas espécies de plantas em resposta a patógenos virais, fúngicos e nematoides por exemplo (BAZZINI et al., 2007; HEWEZI et al., 2008; LU et al., 2007; XIN et al., 2010). Em *Musa*, esta família de miRNA foi caracterizada nos subgrupos Cavendish e Rasthali (GHAG; SHEKHAWAT; GANAPATHI, 2015) e foi relatada como sendo regulada positivamente em resposta ao estresse térmico (ZHU et al., 2019), bem como durante a interação com *F. oxysporum* f. sp. *ubense* raça tropical 4 (FEI et al. 2019). Aqui, esta família do miRNA156 foi a mais abundante observada no estudo, com 25 membros caracterizados ao longo dos tratamentos. A análise de expressão diferencial em termos de abundância de reads, embora não tenha sido significativa, mostrou que esse miRNA e seu gene-alvo (miR156b-5p-Ma09\_g28300) na análise de RT-qPCR em 3DAI tiveram uma correlação inversa com a expressão do gene-alvo (*SPL*) em *M. acuminata*. Isso sugere que essa família de miRNA pode estar envolvida com resposta ao estresse biótico.

### **miRNA166**

O miR166 é uma família conhecida por ter como alvo fatores de transcrição da família HD-Zip homeobox, envolvidos no desenvolvimento de plantas (MIYASHIMA et al., 2011). Tal como acontece com os membros miR159, a regulação negativa da sinalização de ácido abscísico (ABA) também pode favorecer as vias imunológicas mediadas por ácido salicílico (SA) (ZHANG et al., 2011). Fei et al. (2019) relataram a maior abundância deste miRNA em *M. acuminata* Cavendish cv. 'Williams' em relação a outras famílias de miRNAs, com regulação positiva em resposta à inoculação com *F. oxysporum* f. sp. *ubense* raça tropical 4. Da mesma forma, a regulação positiva foi relatada após a infecção com o vírus *Banana Streak Mysore* (BSMyV) (SHEEBA; SELVARAJAN; MUSTAFFA, 2013), bem como durante a infecção de oídio em trigo (XIN et al., 2010), e em respostas de soja a *Phytophthora sojae* (WONG et al., 2014). Curiosamente, os últimos autores também confirmaram que o miR166 é responsivo aos PAMPs, por meio da investigação de *P. sojae* inativada pelo calor. Neste trabalho, a família desse miRNA também foi abundante, com 20 membros observados ao longo dos tratamentos. A análise de expressão diferencial dos dados de sequenciamento em termos de abundância de reads durante a interação com *P. musae*, embora não significativa, mostrou evidências de modulação, com a expressão positiva em 12DAI em relação aos controles, bem

como a regulação negativa dos membros em ambos os momentos. Essa regulação negativa também foi descrita na resposta de defesa ao fungo hemibiotrófico *Colletotrichum graminicola* em milho (BALMER et al., 2017).

### **miRNA171**

Neste estudo foram identificados diversos membros da família do miRNA171. Já foi demonstrado que os membros da família do miRNA171 são conhecidos por clivar produtos de mRNA de genes do fator de transcrição SCARECROW-LIKE (SCL), que regulam os padrões de raiz e caule e sinalização de hormônio vegetal. Foi demonstrado que a regulação negativa na interação de *Arabidopsis* com *Heterodera schachtii*. promoveu o parasitismo do nematóide de cisto (HEWEZI et al., 2008). Em nosso estudo foi caracterizado um total de 19 membros, baseado no conjunto de dados de sequenciamento com base na abundância de reads, foi visto que embora esse miRNA não tenha mostrado uma expressão significativa ele nos forneceu evidências de regulação positiva da expressão em relação aos controles observada aos 12DAI, bem como a regulação negativa dos membros em ambos os timepoints. Esse miRNA de acordo com as análises de expressão via RT-qPCR, em 3DAI o miRNA e seu gene alvo (miRNA171a-3p-Ma06\_g38750 e miRNA171e-3p-Ma06\_g38750), evidenciaram uma correlação negativa com a expressão do gene-alvo (*scarecrow-like protein*) em *M. acuminata*, apoiando o envolvimento desta família de miRNA na resposta ao estresse biótico.

### **miRNA396**

Os membros da família do miRNA396 têm como gene alvo o fator de regulação do crescimento (*GRF*), uma família de fatores de transcrição que regula o desenvolvimento da planta e que também está envolvido nas respostas ao estresse (LIU et al., 2014). Também foram fornecidas evidências de que os membros da família do miRNA396 desempenham um papel importante na resposta de defesa em citros à doença de Huanglongbing, tendo como alvo tanto proteases quanto quinases semelhantes ao receptor LRR (RAWAT et al., 2015). Neste trabalho 17 membros foram caracterizados, tendo como alvo os genes que codificam proteínas do fator 1 relacionadas ao crescimento. Com base na abundância de reads, tendências foram observadas, embora não significativas, tanto para regulação positiva quanto negativa em 3 e 12 DAI respectivamente.

### **miRNA167**

A família do miRNA167 tem como genes-alvo o fator de resposta de auxina (*ARF*)

(WU; POETHIG, 2006a), com o miRNA induzida por *flg22* (LI et al., 2010b) e regulada negativamente em resposta ao patógeno necrotrófico *Verticillium dahliae* em berinjela (LUO et al., 2014). A modulação positiva também foi descrita em *Arabidopsis* na interação compatível com *Heterodera schachtii* (HEWEZI et al., 2008). Aqui, um total de 14 membros foram expressos entre os tratamentos e com maior abundância em 12DAI durante a resposta a *P. musae*, embora não significativo. Os dados de expressão gênica via RT-qPCR para os seguintes pares de miRNAs e genes-alvos (miRNA167b-3p-Ma11\_g01530, miRNA167a-5p-Ma11\_g01530 e miRNA167a-3p-Ma11\_g01530) evidenciaram regulação positiva do miRNA e repressão do gene -alvo (*ARF 12*) durante resposta ao patógeno fúngico. Isso pode ter ocorrido pelo fato de que a planta estar investindo energia na resposta de defesa, ao invés do crescimento. Da mesma forma, a expressão gênica via RT-qPCR para (miR167a-3p-Ma04\_g10650) mostrou regulação positiva do miRNA e regulação negativa do gene-alvo que codifica uma acireductona dioxigenase.

### **miRNA172**

A família do miRNA172 é conhecida por estar envolvida no desenvolvimento de plantas, em *Arabidopsis*, e possui como genes-alvos os fatores de transcrição do tipo Apetala 2 envolvidos na floração (WU et al., 2009). Em nosso estudo, um total de 14 membros da família do miR172 foram caracterizados, porém não apresentaram expressões significativas com base na abundância de *reads*. Embora não significativa, nos forneceu evidências de regulação negativa em 3 e 12DAI, com genes alvos que codificam um IAA6 responsiva a auxinas e uma proteína APETALA 2.

### **miRNA160**

Os membros da família do miRNA160 têm como genes-alvo os genes do fator de resposta a auxina (*ARF*) (MALLORY; BARTEL; BARTEL, 2005). Dado o papel crítico da auxina no desenvolvimento de sítios de alimentação para nematoides de cistos e galhas, membros da família miR160 foram relatados como modulados na interação compatível *Arabidopsis-H. schachtii* (HEWEZI et al., 2008). Embora a regulação positiva em resposta a estresses bióticos tenha sido observada (FAHLGREN et al., 2007), incluindo o PAMP *flg22* (LI et al., 2010b), membros da família miR160 também foram relatados por serem reprimidos durante a infecção de *Pinus taeda* L. por *Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme* (LU et al., 2007) e em respostas de berinjela a *V. dahliae* (LUO et al., 2014). Com 10 membros observados entre os tratamentos, a regulação negativa foi observada em ambos os tempos durante a interação

incompatível com *P. musae* e, indicando que a modulação fina desta família de miRNA envolvida na sinalização de auxina pode estar envolvido na resposta de resistência do patógeno.

### **miRNA164**

Embora não seja observado na predição do gene-alvo neste estudo, os membros da família miRNA164 são conhecidos por direcionar a expressão dos fatores de transcrição que codificam o domínio NAC (GUO et al., 2005), envolvidos na sinalização de auxina e no desenvolvimento da raiz lateral (XIE et al., 2000). Em *Musa*, foi relatado que este miRNA é regulado positivamente em resposta ao estresse térmico, regulando proteínas contendo o domínio NAC envolvidas no desenvolvimento e nas respostas ao estresse (ZHU et al., 2019). Um total de 10 membros da família do miRNA164 foram caracterizados ao longo dos tratamentos, com evidência, embora não significativa para regulação negativa e positiva da expressão em 3DAI e 12DAI, com genes- alvos dos miRNAs, uma provável indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.5 a 14-3-3-like proteína e uma provável alpha glicosidase. Os dados de expressão gênica de RT-qPCR com a combinação miRNA164c-5p-Ma11\_g24070 evidenciaram regulação negativa do miRNA e regulação positiva do seu gene-alvo. A regulação negativa desse miRNA foi relatada também em resposta a *M. oryzae* (BUNDÓ et al., 2020).

### **miRNA168**

O miRNA168 tem como gene- alvo *AGO1* (*argonauta 1*), uma enzima central na via de miRNA e parte do complexo de silenciamento induzido por RNAi (VAUCHERET; MALLORY; BARTEL, 2006). Como tal, a regulação do AGO1 impacta sua disponibilidade e ação de silenciamento subsequente de famílias de miRNA adicionais. Mudanças na expressão de miRNA168 e *AGO1* foram observadas em uma série de interações planta-patógeno, com regulação positiva e regulação negativa observada em resposta ao desafio do patógeno. Por exemplo, a regulação positiva foi descrita em *Brachypodium distachyon* em resposta a *Magnaporthe oryzae* (ZANINI et al., 2021), com a regulação negativa ocorrendo na soja durante a interação com *P. sojae* (WONG et al., 2014). Aqui, um total de nove membros da família do miRNA168 foram caracterizados, com evidência dos dados de sequenciamento, embora não significativa, de regulação negativa tanto em 3DAI quanto em 12DAI. O ajuste fino da expressão de *AGO1* e seu impacto na maquinaria geral de RNAi é, provavelmente, um componente importante das interações planta-patógeno (ŠEČIĆ; KOGEL; LADERA-CARMONA, 2021).

### **miRNA159**

Os membros da família do miR159 são conhecidos por ter como alvo os fatores de transcrição MYB (RHOADES et al., 2002) que estão envolvidos no desenvolvimento da planta, metabolismo e resposta ao estresse biótico e abiótico (AMBAWAT et al., 2013). A implicação do miR159 em respostas das plantas ao nematoide das galhas, *Meloidogyne incognita* foi demonstrada em mutantes de *Arabidopsis* (MEDINA et al., 2017), com regulação negativa relatada em trigo durante a interação com *Blumeria graminis* (XIN et al., 2010) e em pinho durante a interação com *Cronartium quercuum* (LU et al., 2007). Em *Musa*, este miRNA mostrou ser regulado negativamente em resposta ao estresse térmico, com o gene alvo sendo um fator de transcrição PCF/TCP associado ao desenvolvimento da planta (ZHU et al., 2019). A regulação positiva, por outro lado, foi relatada na interação com *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raça tropical 4 (FEI et al., 2019). Como reguladores negativos das vias de sinalização ABA (ácido abscísico), esses autores especulam que essa família pode resultar na ativação das vias SA (ácido salicílico) em respostas imunes ao patógeno fúngico. Aqui, um total de sete membros da família miR159 foram caracterizados, com evidência, embora não significativa, de regulação negativa de dois membros durante a interação com *P. musae*.

### **miRNA169**

A família do miRNA169 contém quatro *loci* em *Arabidopsis*, com genes alvo envolvidos em uma série de processos diferentes relacionados à defesa e desenvolvimento de plantas (ZHANG et al., 2017). Também responsivo a PAMPs como *flg22* (LI et al., 2010b), a regulação negativa no milho durante a interação com *Colletotrichum graminicola* também foi descrita, associada ao aumento da sinalização de JA (ácido jasmônico) (BALMER et al., 2017). Aqui, um total de seis membros da família do miRNA169 foram expressos em todos os tratamentos, embora não significativos, com os dados de sequenciamento revelando regulação positiva durante a interação com *P. musae*.

### **miRNA393**

Como o primeiro miRNA de planta a ser modulado em resposta a estresses bióticos (NAVARRO et al., 2006), os membros da família miRNA393, conforme observado aqui, têm como alvos o *Transport Inhibitor Response 1* (TIR1)/Auxin signaling F-Box (AFB), co-receptores de auxina (SUNKAR; ZHU, 2004), normalmente, reprimindo a sinalização de

auxina e permitindo aumento do ácido salicílico em respostas a patógenos hemibiotróficos. Por exemplo, o miRNA 393 demonstrou, por meio de experimentos de perda de função, desempenhar um papel de resposta imune a *Phytophthora sojae* em soja (WONG et al., 2014), com indução de expressão também observada na interação *Arabidopsis-Pseudomonas syringae* (FAHLGREN et al., 2007). Com seis membros caracterizados neste estudo, uma ligeira regulação negativa foi observada em 3 e 12 DAI embora não significativa, em contraste com os padrões de modulação esperados para patógenos hemibiotróficos e, potencialmente, indicativos de envolvimento na redução da sinalização SA. Os dados de expressão gênica via RT-qPCR em 3DAI revelaram que a expressão do miRNA e gene alvo (miR393b-3p-Ma06\_g18000) foi positiva e também mostrou evidência de que o gene-alvo TIR1, teve uma correlação negativa de expressão de receptores de auxina, também observada em respostas de resistência em *Arabidopsis* a *P. syringae* (NAVARRO et al., 2006).

### **miRNA535**

Recentemente, foi relatado que os membros da família do miRNA535 eram modulados durante as respostas fisiológicas ao estresse salino em *Musa*, com regulação negativa associada à regulação positiva de genes-alvo que codificam enzimas serina/treonina-proteína quinase (LEE et al., 2015). Os dados de sequenciamento, embora não significativos, revelaram abundância de *reads* indicativa de regulação negativa em 3DAI e regulação positiva em 12DAI. A análise de RT-qPCR revelou uma expressão estável de miRNA535d-5p e o gene alvo Ma08\_g07960, que codifica uma proteína ribossômica 30S S17. Esses resultados sugerem que, embora não tenha sido observado uma regulação significativa na expressão gênica, os membros da família do miRNA535 parecem desempenhar um importante papel na defesa da planta.

### **miRNAs menos abundantes e potencialmente envolvidos nas respostas imunes de plantas**

Alguns exemplos de miRNAs menos abundantes das famílias caracterizadas nesse trabalho e que estão potencialmente envolvidos em resposta imune da planta, incluem, miRNA398 que é conhecido por ter como alvo genes ERF que estão envolvidos em vias de resistência a doenças de fitohormônios (GUTTERSON et al., 2004; ZHU et al., 2020). Aqui, a regulação positiva foi observada em 3DAI com base nos dados de sequenciamento.

Na ausência do desafio do patógeno, a família do miRNA482 é conhecida por estar envolvida no silenciamento de genes NLR envolvidos em respostas imunes, desencadeadas por

efetores em diferentes espécies de plantas, por meio da produção de phasiRNAs (ZHAI et al., 2011; ZHU et al., 2013). Como tal, a superexpressão do miRNA482 pode aumentar a suscetibilidade, conforme observado na infecção por *V. dahliae* em batata (YANG et al., 2015a). Por outro lado, na presença do patógeno o miRNA482 pode ser silenciado, com subsequente aumento da expressão do gene-alvo NLR, resultando em resistência a doenças (ZHU et al., 2013). Aqui, um membro da família foi caracterizado, com regulação negativa observada em 3 e 12DAI, embora não significativa, com a repressão de NLR durante o desafio do patógeno.

Da mesma forma, outros miRNAs envolvidos na repressão do gene NLR também foram encontrados, como o miRNA2118, produzindo phasiRNA tendo como alvo o motivo P-loop conservado do domínio de ligação de nucleotídeo em *Medicago truncatula* (ZHAI et al., 2011). Aqui, tanto a regulação negativa em 3DAI, quanto a regulação positiva modesta em 12DAI foram observadas, visando a proteína de resistência a doenças NLR RPS2.

A família do miR397 é conhecido por ter como alvo os genes de lacases *LAC4* e *LAC17*, uma família de genes envolvidos na biossíntese de lignina e o espessamento da parede celular (ABDEL-GHANY; PILON, 2008). Outros genes-alvos também incluíram *HSP40* (*heat shock protein 40*), *LEA* (*late embryogenesis abundant*) e *SPRY* (*Spla/ryanodine receptor*), todos os quais codificam proteínas envolvidas na formação da madeira, conforme descrito em *Populus tomentosa* (CHEN et al., 2015). Em nosso estudo, os dados de expressão do sequenciamento foram significativos estatisticamente, evidenciando regulação positiva em 3DAI. Já os dados de expressão gênica via RT-qPCR com o conjunto de (miRNA397a-Ma03\_g128502) evidenciou regulação negativa do miRNA em relação ao gene-alvo.

### **Novos miRNAs identificados em *Musa***

Um total de 24 novos miRNAs foram identificados nesse estudo, dos quais também foram diferencialmente expressos em conjuntos de cDNA inoculados com *P. musae* e não inoculados, representando a primeira descrição desses miRNAs neste genótipo resistente de *M. acuminata* ssp. *burmannicoides* Calcutta 4. Embora nenhuma modulação significativa da expressão tenha sido observada, os diversos alvos gênicos desses miRNAs podem indicar uma série de mecanismos distintos envolvidos na resposta de defesa mediada por miRNAs.

## 8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A caracterização dos miRNAs em *M. acuminata* var. Calcutta 4 e seu papel na modulação da expressão gênica durante a interação com *P. musae* fornece recursos para o desenvolvimento de métodos eficientes de controle da Sigatoka-amarela. Um total de 226 miRNAs foram caracterizados nesse estudo, sendo 24 novos miRNAs identificados neste genótipo resistente. Os membros de miRNA conservados incluem aqueles das famílias miRNA156, miRNA166, miRNA171, miRNA396, miRNA167, miRNA172, miRNA160, miRNA164, miRNA168, miRNA159, miRNA169, miRNA393, miRNA535, miRNA482, miRNA2118 e miRNA397, todos conhecidos por estarem envolvidos em resposta imune. Um total de 76 transcritos de genes foram alvos durante a infecção. A classificação de ontologia gênica (GO) indicou numerosos termos de atividade molecular potencialmente relacionados a respostas de defesa que incluíam; atividade de fator de transcrição, ligação a ácido nucleico, ligação de nucleotídeo, atividade de oxidorreductase e atividade de proteína quinase, juntamente com termos de processos biológicos, como regulação da transcrição, resposta a hormônio, oxidação-redução e resposta ao estresse oxidativo.

A caracterização dos miRNAs e seus genes-alvo no hospedeiro fornece uma base para futuras manipulações genéticas por meio de estratégias baseadas em RNA de interferência para o desenvolvimento de cultivares resistentes ao estresse. Essas estratégias podem incluir, entre outras, o silenciamento gênico mediado por RNA em hairpin curto, silenciamento de genes transcricionais, desenvolvimento de miRNAs artificiais, silenciamento e co-supressão de genes induzidos por vírus, knock-out de genes MIR e entrega de miRNAs nanoencapsulados para um *delivery* mais efetivo. Estas estratégias oferecem potencial para permitir a resistência contra diversos estresses em várias espécies de culturas (ZHENG; QU., 2015; BHAKTA et al., 2020). A caracterização de miRNAs envolvidos na transferência entre reinos e seus modos de ação também pode aumentar a compreensão das complexas interações entre plantas e patógenos, com potencial para reduzir a virulência do patógeno ou aumentar as respostas imunes das plantas. Tais avanços favorecem a sustentabilidade agrícola ao trazer benefícios econômicos e ambientais, contribuindo para uma produção mais sustentável. Nesse contexto, o sequenciamento contínuo de alto rendimento e o desenvolvimento de ferramentas de bioinformática por nosso grupo permitirão a predição de miRNAs, microRNA-like small RNAs (miRNAs) e genes-alvo tanto na planta hospedeira *M. acuminata* var. Calcutta 4, quanto no patógeno fúngico *P. musae*.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. *Plant Pathology*. 5. ed. San Diego, EUA: Elsevier Academic Press, 2005.
- AMORIM, E. P. et al. New microsatellite markers for bananas (*Musa spp*). *Genetics and Molecular Research*, v. 11, n. 2, p. 1093–1098, 2012.
- AXTELL, M. J. ShortStack: Comprehensive annotation and quantification of small RNA genes. *Rna*, v. 19, n. 6, p. 740–751, 2013.
- AGARWAL, P. K. et al. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports*, v. 25, n. 12, p. 1263–1274, 2006.
- AKDOGAN, G. et al. miRNA-based drought regulation in wheat. *Functional and Integrative Genomics*, v. 16, n. 3, p. 221–233, 2016.
- AMORIM, E. P. et al. New microsatellite markers for bananas (*Musa spp*). *Genetics and Molecular Research*, v. 11, n. 2, p. 1093–1098, 2012.
- ALTSCHUL, S. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1 set. 1997
- BARTEL, D. P. MicroRNAs : Genomics , Biogenesis , Mechanism , and Function. *cell*, v. 116, p. 281–297, 2004.
- BAULCOMBE, D. RNA silencing in plants. *Nature*, v. 431, n. 7006, p. 356–363, 2004.
- BELSER, C. et al. Telomere-to-telomere gapless chromosomes of banana using nanopore sequencing. *Communications Biology*, v. 4, n. 1, 2021.
- BRITO, F. Diversidade genética de populações de *Mycosphaerella musicola* e caracterização do efector LysM em *Mycosphaerella graminicola*. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2015.
- BRITO, F. S. D. et al. Genetic diversity and azole fungicide sensitivity in *Pseudocercospora musae* field populations in Brazil. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, n. 99, p. 1–13, 2020.
- BHAKTA, S.; TAK, H.; GANAPATHI, T. R. Exploring diverse roles of micro RNAs in banana: Current status and future prospective. *Physiologia Plantarum*, n. November, p. 1–12, 2020.
- BOLLER, T.; FELIX, G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology*, v. 60, p. 379–406, 2009.
- BOLLER, T.; HE, S. Y. Innate Immunity in Plants: An Arms Race Between Pattern Recognition Receptors in Plants and Effectors in Microbial Pathogens. *Science*, v. 324, n. 5928, p. 742–744, 8 maio 2009.
- BOONRUANGROD, R.; FLUCH, S.; BURG, K. Elucidation of origin of the present day hybrid banana cultivars using the 5'ETS rDNA sequence information. *Molecular Breeding*, v. 24, n. 1, p. 77–91, 2009.

- BORGES, A. L.; MATOS, A. P. DE. Banana: Instruções Práticas de Cultivo. **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, v. 1, p. 29, 2006.
- BORGES, A. L.; SOUZA, L. DA S. **O cultivo da bananeira**. 1º edição ed. Cruz das Almas-BA: 2004, 2004.
- Bundó, M.; Campo, S.; San Segundo, B. Role of microRNAs in Plant–Fungus Interactions. In *Plant microRNAs: Shaping Development and Environmental Responses*, 1st ed.; Springer Nature: New York, NY, USA, 2020; p. 199–220.
- BRENNECKE, J. et al. Principles of microRNA-target recognition. **PLoS Biology**, v. 3, n. 3, p. 0404–0418, 2005.
- CASTAÑEDA, N. E. N. et al. Gene expression analysis in *Musa acuminata* during compatible interactions with *Meloidogyne incognita*. *Annals of Botany*, v. 119, n. 5, p. 915– 930, 2017.
- CALOU, V. B. C. et al. The use of UAVs in monitoring yellow sigatoka in banana. **Biosystems Engineering**, v. 193, p. 115–125, maio 2020.
- CHEESMAN. *Kew Bulletin*,. **Classification of the Bananas: The Genus *Musa* L.**, v. 2, n. 2, p. 106–117, 1947.
- CHURCHILL, A. C. L. *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: Progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, n. 4, p. 307–328, 2011.
- CORDEIRO, Z. J. M.; KIMATI, H. Doenças da bananeira (*Musa* spp.). In: KIMATI, H. et al.(Eds.). *Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. 3. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1997. p. 113–136.
- CORDEIRO, Z.; MATOS, A.; MEISSNER FILHO, P. Doenças e métodos de controle. In: BORGES, A.; SOUZA, L. (Eds.). *O cultivo da bananeira*. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2004. p. 146–182.
- CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; HADDAD, F. Doenças fúngicas e bacterianas. In: FERREIRA, C. F. et al. (Eds.). **O agronegócio da banana**. Brasília: Embrapa, 2016. p. 545–576.
- CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P. DE; FILHO, P. E. M. Doenças e Métodos de Controle. **O cultivo da bananeira**, p. 146–182, 2004.
- CORDEIRO, Z. J. M.; ROCHA, H. S.; ARAÚJO, A. G. DE. Metodologias para Manuseio de *Mycosphaerella musicola* em laboratório. **Metodologias para manuseio de *Mycosphaerella musicola* em laboratório**, p. 32, 2011.
- CRUZ, V. O. Caracterização de unigenes na interação *Musa acuminata* - *Mycosphaerella musicola*: desenvolvimento de marcadores microssatélites e análise de expressão gênica. 2013.

- CUI, J.; YOU, C.; CHEN, X. The evolution of microRNAs in plants. **Plant Biology**, v. 35, p. 61–67, 2017.
- D'HONT, A. et al. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. **Nature**, v. 488, n. 7410, p. 213–217, 2012.
- DANGL, J. L.; JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, v. 411, n. June, p. 826–833, 2001.
- DASH, P. K.; RAI, R. Translating the “banana genome” to delineate stress resistance, dwarfing, parthenocarpy and mechanisms of fruit ripening. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. OCTOBER2016, p. 1–7, 2016.
- DAVEY, M. W. et al. “ A draft *Musa balbisiana* genome sequence for molecular genetics in polyploid, inter- and intra-specific *Musa* hybrids”. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, 2013.
- DE BELLAIRE, L. D. L. et al. Black Leaf Streak Disease is challenging the banana industry. **Fruits**, v. 65, n. 6, p. 327–342, 2010.
- DJAMI-TCHATCHOU, A. T. et al. Functional Roles of microRNAs in Agronomically Important Plants—Potential as Targets for Crop Improvement and Protection. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. March, 2017.
- DODDS, P. N.; RATHJEN, J. P. Plant immunity: Towards an integrated view of plant–pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 8, p. 539–548, 2010.
- DONATELLI, M. et al. Modelling the impacts of pests and diseases on agricultural systems. **Agricultural Systems**, v. 155, p. 213–224, jul. 2017.
- DRENTH, A.; KEMA, G. The Vulnerability of Bananas to Globally Emerging Disease Threats. **Phytopathology**, v. 111, n. 12, p. 2146–2161, 2021.
- DUTTA, S. et al. Leaf rust (*Puccinia triticina*) mediated RNAi in wheat (*Triticum aestivum* L.) prompting host susceptibility. **Functional and Integrative Genomics**, v. 19, n. 3, p. 437–452, 2019.
- EMBRAPA. fisiográfica em 2019. p. 1–4, 2019.
- FAO. FAOSTAT Food and agriculture data - 2018. Disponível em: . Acesso em: 13 abr. 2020.
- FEI, Q. et al. Small RNAs Add Zing to the Zig-Zag-Zig Model of Plant Defenses. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, 2016.
- FERREIRA, C. F. et al. O agronegócio da banana. v. 1, p. 832, 2015.
- FREITAS, A. S. et al. Infection process of *Pseudocercospora musae* on banana leaf. **Phytoparasitica**, v. 45, n. 3, p. 317–324, 2017.
- FRIESEN, T. L. Combating the Sigatoka Disease Complex on Banana. **PLoS Genetics**, v. 12,

n. 8, p. 9–12, 2016.

- FLEIGE, S.; PFAFFL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 27, n. 2–3, p. 126–139, 2006.
- FUNGO, R.; PILLAY, M.  $\beta$ -carotene content of selected banana genotypes from Uganda. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, n. 28, p. 5423–5430, 2011.
- GRIFFITHS-JONES, S. et al. miRBase: Tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*, v. 36, n. SUPPL. 1, p. 154–158, 2008.
- GONZÁLEZ-MENDOZA, D. et al. A rapid method for isolation of total DNA from pathogenic filamentous plant fungi. *Genetics and Molecular Research*, v. 9, n. 1, p. 162–166, 2010.
- H.KIMATI et al. **Manual de Fitopatologia, Vol II**. 3. ed. São Paulo: [s.n.].
- HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, T. Domestication, Genomics and the Future for Banana. *Annals of Botany*, v. 100, n. 5, p. 1073–1084, 28 jul. 2007.
- INAL, B. et al. Genome-wide fungal stress responsive miRNA expression in wheat. *Planta*, v. 240, n. 6, p. 1287–1298, 2014.
- JEYARAJ, A. et al. Identification of Regulatory Networks of MicroRNAs and Their Targets in Response to *Colletotrichum gloeosporioides* in Tea Plant (*Camellia sinensis* L.). *Frontiers in Plant Science*, v. 10, n. September, p. 1–22, 2019.
- JIA, Y. et al. Characteristic dissection of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* responsive micrnas in rice. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 3, 2020.
- JIANG, N. et al. Function identification of miR482b, a negative regulator during tomato resistance to *Phytophthora infestans*. *Horticulture Research*, v. 5, n. 1, 2018.
- JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. *Nature*, v. 444, n. 7117, p. 323–329, 2006.
- KIMUNYE, J. N. et al. Distribution of *Pseudocercospora* species causing Sigatoka leaf diseases of banana in Uganda and Tanzania. *Plant Pathology*, v. 69, n. 1, p. 50–59, 2020.
- KALVARI, I. et al. Non-Coding RNA Analysis Using the Rfam Database. *Current Protocols in Bioinformatics*, v. 62, n. 1, p. e51, jun. 2018.
- KULCHESKI, F. R. et al. Identification of novel soybean microRNAs involved in abiotic and biotic stresses. *BMC genomics*, n. 12, p. 1–18, 2011.
- KUMAKECH, A. et al. Plant extracts as potential control agents of Black Sigatoka in banana. *Journal of Plant Pathology*, v. 104, n. 4, p. 1303–1314, 2022.
- LAGOS-QUINTANA, M. et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, v. 294, n. 5543, p. 853–858, 2001.
- LAKHWANI, D. et al. Novel microRNAs regulating ripening-associated processes in banana fruit. *Plant Growth Regulation*, v. 90, n. 2, p. 223–235, 2020.

- LEE, R. C.; AMBROS, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 862–864, 2001.
- 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 Press**, v. 75, p. 843–854, 1993.
- LEE, Y. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **the EMBO Journal**, v. 23, n. 20, p. 4051–4060, 2004.
- LI, X.; KAPOS, P.; ZHANG, Y. NLRs in plants. **Current Opinion in Immunology**, v. 32, p. 114–121, 2015.
- LIU, Q.; CHEN, Y. Q. A new mechanism in plant engineering: The potential roles of microRNAs in molecular breeding for crop improvement. **Biotechnology Advances**, 2010.
- LIU, W. et al. High-throughput sequencing of small RNAs revealed the diversified cold-responsive pathways during cold stress in the wild banana (*Musa itinerans*). **BMC Plant Biology**, v. 18, n. 1, p. 1–26, 2018.
- LUAN, Y.; CUI, J.; ZHAI, J. High-throughput sequencing reveals differential expression of miRNAs in tomato inoculated with *Phytophthora infestans*. **Planta**, p. 1405–1416, 2015.
- MARÍN, D. H. et al. Black Sigatoka: An Increasing Threat to Banana Cultivation. **The American Phytopathological Society**, v. 87, n. 3, 2003.
- MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet.journal**, v. 17, n. 1, p. 10, 2 maio 2011.
- MARTIN, G. et al. Improvement of the banana “*Musa acuminata*” reference sequence using NGS data and semi-automated bioinformatics methods. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2016.
- MATTICK, J. S. Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. **EMBO reports**, v. 2, n. 11, p. 986–991, nov. 2001.
- MEREDITH, D. S.; LAWRENCE, J. S. Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 52, n. 3, p. 459–476, 1969.
- MILLER, R. N. et al. Analysis of non-TIR NBS-LRR resistance gene analogs in *Musa acuminata* Colla: Isolation, RFLP marker development, and physical mapping. **BMC Plant Biology**, v. 8, n. 1, p. 15, 2008.
- MILLER, R. N. et al. Characterization of novel microsatellite markers in *Musa acuminata* subsp. *burmannicoides*, var. *Calcutta 4*. **BMC Research Notes**, v. 3, p. 2–7, 2010.
- MCCARTHY, D. J.; CHEN, Y.; SMYTH, G. K. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. **Nucleic Acids Research**, v.

40, n. 10, p. 4288–4297, 2012.

MONAGHAN, J.; ZIPFEL, C. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, n. 4, p. 349–357, 2012.

MOURICHON, X.; CARLIER, J.; FOURÉ, E. Sigatoka leaf spot diseases. Montpellier: INIBAP, 1997.

NANSAMBA, M. et al. Breeding banana (*Musa* spp.) for drought tolerance: A review. **Plant Breeding**, v. 139, n. 4, p. 685–696, 2020.

NAVARRO, L. et al. A Plant miRNA Contributes to Antibacterial Resistance by Repressing Auxin Signaling. **SCIENCE**, v. 312, n. 5772, p. 436–439, 2006.

NOAR, R. D.; DAUB, M. E. Transcriptome sequencing of *Mycosphaerella fijiensis* during association with *Musa acuminata* reveals candidate pathogenicity gene. **BMC genomics**, v. 17, p. 690, 2016.

NUNES, C. C. et al. Diverse and tissue-enriched small RNAs in the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe oryzae*. **BMC Genomics**, v. 12, p. 1–20, 2011.

OUYANG, S. et al. MicroRNAs Suppress NB Domain Genes in Tomato That Confer Resistance to *Fusarium oxysporum*. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, p. e1004464, 16 out. 2014.

PARENT, J. S.; DE ALBA, A. E. M.; VAUCHERET, H. The origin and effect of small RNA signaling in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, n. AUG, p. 1–9, 2012.

PARK, M. Y. et al. Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, n. 10, p. 3691–3696, 2005.

PARK, J. H.; SHIN, C. The role of plant small RNAs in NB-LRR regulation. **Briefings in Functional Genomics**, v. 14, n. 4, p. 268–274, 2015.

PATEL, P. et al. Overexpression of native *Musa*-miR397 enhances plant biomass without compromising abiotic stress tolerance in banana. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 16434, 11 dez. 2019.

Pinheiro TDM, Rego ECS, Alves GSC, Fonseca FCA, Cotta MG, Antonino JD, Gomes TG, Amorim EP, Ferreira CF, Costa MMDC, Grynberg P, Togawa RC, Miller RNG. 2022. Transcriptome Profiling of the Resistance Response of *Musa acuminata* subsp. *burmannicoides*, var. Calcutta 4 to *Pseudocercospora musae*. *Int J Mol Sci*. 23: 13589. doi: 10.3390/ijms232113589.

QU, J. et al. Identification and Characterization of Small Noncoding RNAs in Genome Sequences of the Edible Fungus *Pleurotus ostreatus*. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 25–28, 2016.

RAMÍREZ-SÁNCHEZ, M.; HUBER, D. J.; VALLEJOS, C. E. Abiotic stress triggers ROS-mediated programmed cell death in banana (*Musa* sp., AAA group, Cavendish sub-

- group) fruit. **Scientia Horticulturae**, v. 293, n. August 2021, 2022.
- REUBER, T. L.; AUSUBE, F. M. Isolation of Arabidopsis Genes That Differentiate between Resistance Responses Mediated by the RPS2 and RPM7 Disease Resistance Genes. **the Plant Cell Online**, v. 8, n. 2, p. 241–249, 1996.
- REGO, E. C. S. et al. Stable reference genes for RT-qPCR analysis of gene expression in the *Musa acuminata*-*Pseudocercospora musae* interaction. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019
- SILVA, S. D. O. E. et al. Melhoramento genético da bananeira: Estratégias e tecnologias.
- SEO, J.-K. et al. Contribution of Small RNA Pathway Components in Plant Immunity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, n. 6, p. 617–625, 2013.
- SONG, X. et al. MicroRNAs and Their Regulatory Roles in Plant-Environment Interactions. *Annual Review of Plant Biology*, v. 70, p. 1–37, 2019.
- SHIVAPRASAD, P. V. et al. A microRNA superfamily regulates nucleotide binding site-leucine-rich repeats and other mRNAs. **Plant Cell**, v. 24, n. 3, p. 859–874, 2012.
- SHRIRAM, V. et al. MicroRNAs As Potential Targets for Abiotic Stress Tolerance in Plants. **Frontiers in plant science**, 2016.
- SHUKLA, L. I.; CHINNUSAMY, V.; SUNKAR, R. The role of microRNAs and other endogenous small RNAs in plant stress responses. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1779, n. 11, p. 743–748, 2008.
- SILVA, S. D. O. E. et al. Melhoramento genético da bananeira: Estratégias e tecnologias disponíveis. **Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal**, v. 35, p. 919–931, 2013.
- SIMMONDS, N. W.; SHEPHERD, K. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. **The Botany Journal of the Linnean Society of London**, v. 55, n. 359, p. 302–312, 1955.
- SIMMONDS, N. W. Diseases. In: *Bananas*. 2. ed. Londres: Longmans, 1966. p. 366–408.
- SOARES, J. M. S. et al. Genetic Improvement for Resistance to Black Sigatoka in Bananas: A Systematic Review. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, n. April, p. 1–15, 2021.
- SONG, S. et al. Identification of miRNAs differentially expressed in *Fusarium* wilt-resistant and susceptible banana varieties. **South African Journal of Botany**, v. 106, p. 244–249, 2016.
- SONG, S. et al. Identification and characterization of miRNA169 family members in banana (*Musa acuminata* L.) that respond to *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Cubense* infection in banana cultivars. **PeerJ**, v. 2018, n. 12, 2018.

- STAIGER, D. et al. Emerging role for RNA-based regulation in plant immunity. **New Phytology**, v. 197, n. 2, p. 394–404, 2013.
- STOVER, R. H. Leaf spot of bananas caused by *M. musicola*: role of conidial in epidemiology. **Phytopathology**, p. 856–860, 1970.
- STOVER R.H. Sigatoka Leaf Spots of Bananas and plantain. **Plant disease**, v. 64, n. 8, p. 750–756, 1980.
- SUNKAR, R.; JAGADEESWARAN, G. In silico identification of conserved microRNAs in large number of diverse plant species. **BMC plant biology**, v. 8, p. 37, 2008.
- TAO, Y. et al. Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. **Plant Cell**, v. 15, n. 2, p. 317–330, 2003.
- TAY, Y.; RINN, J.; PANDOLFI, P. P. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition. **Nature**, v. 505, n. 7483, p. 344–352, 2014.
- TRIPATHI, L.; NTUI, V. O.; TRIPATHI, J. N. Application of genetic modification and genome editing for developing climate-smart banana. **Food and Energy Security**, v. 8, n. 4, p. 1–16, 2019.
- VAUCHERET, H.; MALLORY, A. C.; BARTEL, D. P. AGO1 Homeostasis Entails Coexpression of MIR168 and AGO1 and Preferential Stabilization of miR168 by AGO1. **Molecular Cell**, v. 22, n. 1, p. 129–136, 2006.
- VIDYA, S. M.; RAVISHANKAR, K. V; LAXMAN, R. H. Genome wide analysis of heat responsive microRNAs in banana during acquired thermo tolerance. **Journal of Horticultural Sciences**, v. 13, n. 1, p. 61–71, 2018.
- WANG, J. et al. Identification of 20 microRNAs from *Oryza sativa*. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1688–1695, 2004.
- WANG, J. et al. Non-coding RNAs and Their Roles in Stress Response in Plants Wang J et al / miRNA and lncRNA in Plant Stress Response. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 15, n. 5, p. 301–312, 2017.
- WANG, W. et al. Plant immune signaling: Advancing on two frontiers. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 62, n. 1, p. 2–24, 2020.
- WEI, C. et al. The I2 resistance gene homologues in *Solanum* have complex evolutionary patterns and are targeted by miRNAs. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1–14, 2014.
- XIA, K. et al. Overexpression Leads to More Tillers , Early Flowering and Less Tolerance to Salt and Drought in Rice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2012.
- XIN, M. et al. Diverse set of microRNAs are responsive to powdery mildew infection and heat stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 1, p. 123, 24 dez. 2010.

- XIAOCHEN, B.; WANG, S. TargetFinder: A software for antisense oligonucleotide target site selection based on MAST and secondary structures of target mRNA. **Bioinformatics**, v. 21, n. 8, p. 1401–1402, 2005.
- YANG, L. et al. Overexpression of potato miR482e enhanced plant sensitivity to *Verticillium dahliae* infection. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 57, n. 12, p. 1078–1088, 2015.
- YU, B. et al. Methylation as a Crucial Step in Plant microRNA Biogenesis. *Science*, v. 307, n. 5711, p. 932–935, 2005. ZERBINI,
- YUAN, M. et al. PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 62, p. 102030, 2021.
- ZAMORE, P. D.; HALEY, B. Ribo-gnome: The Big World of Small RNAs. **Science**, v. 309, n. 5740, p. 1519–1524, 2 set. 2005.
- ZHAI, J. et al. MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs. **Genes and Development**, v. 25, n. 23, p. 2540–2553, 2011.
- ZHANG, X. et al. *Magnaporthe oryzae* defeats rice defense by inducing miR319b and suppressing Jasmonic acid signaling. **Plant Physiology**, p. pp.01665.2017, 2018.
- ZHOU, J. M.; ZHANG, Y. Plant Immunity: Danger Perception and Signaling. **Cell**, v. 181, n. 5, p. 978–989, 2020.
- ZHU, H. et al. Banana sRNAome and degradome identify microRNAs functioning in differential responses to temperature stress. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, p. 33, 10 dez. 2019.
- ZHU, X. et al. High-Throughput Sequencing-Based Identification of Arabidopsis miRNAs Induced by *Phytophthora capsici* Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. June, p. 1–12, 2020.
- ZIPFEL, C. Plant pattern-recognition receptors. **Trends in Immunology**, v. 35, n. 7, p. 345–351, 2014.

## 10. ANEXO I – MATERIAL SUPLEMENTAR

**Tabela Suplementar 1.** Estatísticas resumidas dos miRNAs conservados conhecidos e novos de *Musa acuminata* var. Calcutta 4.

Family	Loci	Paired miRNAs	Unpaired miRNAs	Unique major miRNAs	Unique miRNA-miRNA*
miR156	25	19	6	6	17
miR157	4	4	0	1	2
miR159	7	4	3	3	3
miR160	10	5	5	3	2
miR162	6	6	0	2	3
miR164	10	9	1	4	8
miR166	20	18	2	3	9
miR167	14	8	6	4	6
miR168	9	9	0	2	5
miR169	6	2	4	3	1
miR171	19	17	2	8	13
miR172	14	13	1	2	7
miR319	3	2	1	3	2
miR390	5	5	0	2	5
miR391	2	2	0	2	2
miR393	6	4	2	2	4
miR395	3	2	1	1	2
miR396	17	16	1	5	15
miR397	1	1	0	1	1
miR398	1	1	0	1	1
miR399	1	0	1	0	0
miR408	1	1	0	1	1
miR482	1	1	0	1	1
miR528	1	1	0	1	1
miR529	4	4	0	2	2
miR530	1	1	0	1	1
miR535	8	8	0	2	6
miR827	1	1	0	1	1
miR1432	1	1	0	1	1
miR2118	1	1	0	1	1
Novel	24	9	15	9	9
<b>Total</b>	<b>226</b>	<b>175</b>	<b>51</b>	<b>78</b>	<b>132</b>

## Novel #1

```
query=chr01:7155057-7155266, target=GG22|c6670_g1_i1, score=3.5, range=550-569, strand=1
Annot: gn|BL_ORD_ID|280540 Q9FHK9.1 RecName: Full=Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 26b

target 5' GCUCGUCCGGUCGGUU-GAU 3'
          : : : : : : : : : : : : : :
query 3' UGAGCAGGCUCAGCCAGCUA 5'
```

## Novel #2

```
query=chr05:5132735-5132813, target=GG150|c3487_g1_i2, score=4, range=0-0, strand=1
Annot: gn|BL_ORD_ID|159087 Q0E2Z7.2 RecName: Full=DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 41

target 5' GGUGAGGGAACAGG-AAAAGGA 3'
          : : : : : : : : : : : :
query 3' CUACUCUCUUGUCCGUUUUUUCU 5'
```

## Novel #3

```
query=chr07:20901036-20901267, target=GG52|c3151_g1_i1, score=3.5, range=639-658, strand=1
Annot: gn|BL_ORD_ID|18692 P19182.2 RecName: Full=Interferon-related developmental regulator 1; AltName: Full=Nerve growth factor-inducible protein PC4; AltName: Full=TPA-induced sequence 7; Short=T157 protein

target 5' CAU-GUUGAGCCUCAGGAA 3'
          : : : : : : : : : : : :
query 3' GURICACUUCUGGGACUCCU 5'
```

## Novel #4

```
query=chr08:3639196-3639285, target=GG22|c3772_g1_i1, score=0, range=1629-1649, strand=1
Annot: gn|BL_ORD_ID|24032 Q8NHP7.4 RecName: Full=pLRNA biogenesis protein EXD1; AltName: Full=Exonuclease 38apos;-58apos; domain-containing protein 1; AltName: Full=Exonuclease 38apos;-58apos; domain-like-containing protein 1; AltName: Full=inactive exonuclease EXD1

target 5' CUACUCUCUUGUCCGUUUUUUCU 3'
          : : : : : : : : : : : :
query 3' GAUGAUGACAGUUGAACAGCU 5'
```

## Novel #5

```
query=chr10:34402590-34402681, target=GG52|c2643_g2_i4, score=3.5, range=1260-1280, strand=1
Annot: gn|BL_ORD_ID|280703 Q9CAG8.1 RecName: Full=F-box/kelch-repeat protein At1g67480

target 5' GCGUGAGACAGAACUUGCCA 3'
          : : : : : : : : : : : :
query 3' AGAACUUUGUCUUGAGCCGGU 5'
```

## Novel #6

```
query=chr09:11246782-11246863, target=GG22|c2238_g2_i1, score=3, range=3074-3095, strand=1
Annot: gn|BL_ORD_ID|272462 Q9FN92.1 RecName: Full=Probable receptor-like protein kinase At5g59700; Flags: Precursor

target 5' GGGCAGCAGAGGCGGGGCGAGA 3'
          : : : : : : : : : : : :
query 3' CCUCUUG-CUCCGUCCCCGUUCU 5'
```

## Novel #7

```
query=chr09:34735640-34735819, target=GG24|c5249_g1_i2, score=4, range=924-944, strand=1
Annot: gn|BL_ORD_ID|427076 P46547.3 RecName: Full=Proline ininopeptidase; Short=PIP; AltName: Full=Prolyl aminopeptidase; Short=PAP

target 5' GCAUUUUCACAUUGAUCACA 3'
          : : : : : : : : : : : :
query 3' CAUGAUGAGUACUUGUGU 5'
```

## Novel #8

```
query=chr01:3237626-3237740, target=GG50|c3177_g2_l3, score=2, range=676-696, strand=1
Annot: gn|BL_ORD_ID|370403 Q9LSG3.1 RecName: Full=Galacturonosyltransferase 8; AltName: Full=Glycosyltransferase QUASIMODO1

target 5' GUCCUCUGCAUCUACCGCGG 3'
          : : : : : : : : : : : :
query 3' CAGUGAGAUUGAUGCAGCU 5'
```

## Novel #9

```
query=chr01:7762935-7763039, target=GG41|c2631_g1_i1, score=3.5, range=777-797, strand=1
Annot: gn|BL_ORD_ID|324572      Q9SE42.1 RecName: Full=Ribulose-phosphate 3-epimerase, cytoplasmic isoform; AltName: Full=Cyt-RPEase; AltName: Full=Penrose-5-phosphate 3-epimerase; Short=PPE; AltName: Full=RPEcyt; AltName: Full=Ribulose-5-phosphate-epimerase

target 5' GGAUAAUCAAUACAGUAA 3'
      ::::::::::::::::::::
query  3' CCUAGUGUGUAGUAGCAU 5'
```

## Novel #10

```
query=chr02:15328566-15328749, target=GG52|c3155_g1_i1, score=3, range=630-649, strand=1
Annot: gn|BL_ORD_ID|5152      B8B9K6.1 RecName: Full=60S ribosomal protein L10a B7F845.1 RecName: Full=60S ribosomal protein L10a

target 5' GCAAGAU-GAUACGAAAGUGA 3'
      ::::::::::::::::::::
query  3' CGAUCUAGCUGUCUUUCACU 5'
```

## Novel #11

```
query=chr02:22236894-22237044, target=GG40|c2316_g1_i1, score=0, range=691-711, strand=1
Annot: gn|BL_ORD_ID|5278      K4BVL1.1 RecName: Full=Protein SPA, chloroplastic; AltName: Full=Sugar partition-affecting protein; Flags: Precursor

target 5' UUCCGUAGAAUUAACAACA 3'
      ::::::::::::::::::::
query  3' AAGGCAUUAUUUGUGUAGU 5'
```

## Novel #12

```
query=chr02:27471405-27471507, target=GG50|c3293_g1_i8, score=4, range=791-810, strand=1
Annot: gn|BL_ORD_ID|359984    Q94KB2.1 RecName: Full=ML0-like protein 13; Short=AtMlo13; Short=AtMlo20

target 5' AU-CUCUUUAAACUUAAUUA 3'
      ::::::::::::::::::::
query  3' UGUGGAAAUUUAAUUAAAGU 5'
```

## Novel #13

```
query=chr04:10607231-10607336, target=GG98|c9128_g1_i1, score=2.5, range=140-159, strand=1
Annot: gn|BL_ORD_ID|850      A0A140I190.1 RecName: Full=Noroxomaritidine synthase; AltName: Full=CYP96T1; AltName: Full=Cytochrome P450 96T1

target 5' GA-CCCCGCCAACUUAAACA 3'
      ::::::::::::::::::::
query  3' CUAGGCCUGUUGCAGUUGGU 5'
```

## Novel #14

```
query=chr04:30762239-30762336, target=GG22|c4367_g1_i1, score=3, range=1930-1950, strand=1
Annot: gn|BL_ORD_ID|194080    Q2RBN7.1 RecName: Full=Clathrin heavy chain 1

target 5' CAUGCUUUUCUUAACUAAG 3'
      ::::::::::::::::::::
query  3' GUAAGGAUAGAGUUUGAUUU 5'
```

## Novel \$15

```
query=chr05:22232500-22232644, target=GG52|c3654_g5_i2, score=4, range=1037-1056, strand=1
Annot: gn|BL_ORD_ID|210607    Q7XA42.2 RecName: Full=Putative disease resistance protein RGA1; AltName: Full=RGA3-blb

target 5' AAGAUUUUGUGACCAUUGA 3'
      ::::::::::::::::::::
query  3' UUGUAAAGUAUGUGGUAACU 5'
```

## Novel #16

```
query=chr05:25109802-25109949, target=GG52|c3471_g1_i1, score=0, range=3077-3097, strand=1
Annot: gn|BL_ORD_ID|273894    Q9GSA7.1 RecName: Full=Calmodulin-binding transcription activator 3; AltName: Full=Ethylene-induced calmodulin-binding protein 1; Short=EICBP1; AltName: Full=Ethylene-induced calmodulin-binding protein a; Short=EICBP.a; AltName: Full=Signal responsive protein 1

target 5' CAUCAAUAUCCUCCUUUUG 3'
      ::::::::::::::::::::
query  3' GUAGGUUAUUGAGGAGAAAC 5'
```

## Novel #17

```
query=chr08:39270564-39270717, target=GG22|c7255_g1_i1, score=0, range=2025-2045, strand=1
Annot: gn|BL_ORD_ID|371080    O80822.2 RecName: Full=Peroxidase 25; Short=Atperox P25; Flags: Precursor

target 5' GGCGAGCAAGUCUAUCAGACA 3'
      ::::::::::::::::::::
query  3' CCGCUCGUUCAGAUAGUCUGU 5'
```

## Novel #18

```
query=chr09:34029225-34029338, target=GG15|c3059_g1_i1, score=3, range=672-692, strand=1
Annot: gn|BL_ORD_ID|282855    Q6AST1.1 RecName: Full=Homeobox-leucine zipper protein HOX32; AltName: Full=HD-ZIP protein HOX32; AltName: Full=Homeodomain transcription factor HOX32; AltName: Full=Hox32

target 5' UUGGGAUGAAGCCUUGCCGG 3'
      ::::::::::::::::::::
query  3' CCCCUAACUUCGACAGGCU 5'
```

## Novel #19

```
query=chr09:40438631-40438862, target=GG15|c2014_g1_i1, score=0.5, range=153-173, strand=1
Annot: gn|BL_ORD_ID|271714    Q9X186.1 RecName: Full=Pollen-specific leucine-rich repeat extensin-like protein 2; Short=AtPEX2; Short=Pollen-specific LRR/EXTENSIN2; AltName: Full=Cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein; Flags: Precursor

target 5' UGGGAUCCCUAAUUAUGAA 3'
      ::::::::::::::::::::
query  3' ACUCUAGGGAUAGAAUACU 5'
```

## Novel #20

```
query=chr10:26852029-26852146, target=GG50|c3533_g1_i1, score=3.5, range=1575-1594, strand=1
Annot: gn|BL_ORD_ID|273933 Q9ZQ96.1 RecName: Full=UDP-glycosyltransferase 73C3

target 5' ACGUUC-UCAUGGGUCUCUU 3'
      ::::: :::::::::::::::
query  3' GGCAGGUAGUACACCAGAGAU 5'
```

## Novel #21

```
query=chr11:2322440-2322581, target=GG50|c3177_g2_i1, score=3.5, range=350-371, strand=1
Annot: gn|BL_ORD_ID|370403 Q9LSG3.1 RecName: Full=Galacturonosyltransferase 8; AltName: Full=Glycosyltransferase QUASIMOD01

target 5' AUUUUGAAUCCCUAUAGUUUAU 3'
      ::::::: :::::::::::::::
query  3' UAUAAACUCUAGAGAUUCAAUUG 5'
```

## Novel #22

```
query=chr11:5710224-5710366, target=GG50|c3177_g2_i1, score=0.5, range=1001-1021, strand=1
Annot: gn|BL_ORD_ID|370403 Q9LSG3.1 RecName: Full=Galacturonosyltransferase 8; AltName: Full=Glycosyltransferase QUASIMOD01

target 5' GAGACAGCAAACCCUCAUCCU 3'
      ::::::: :::::::::::::::
query  3' CUCUGUUUUUGGAGUAGGA 5'
```

## Novel #23

```
Annot: gn|BL_ORD_ID|11109 F4JSH1.1 RecName: Full=Probable apyrase 7; Short=ATAPV7; AltName: Full=ATP-diphosphatase; AltName: Full=ATP-diphosphohydrolase; AltName: Full=Adenosine diphosphatase; Short=ADPase; AltName: Full=NTPDase; AltName: Full=Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 7

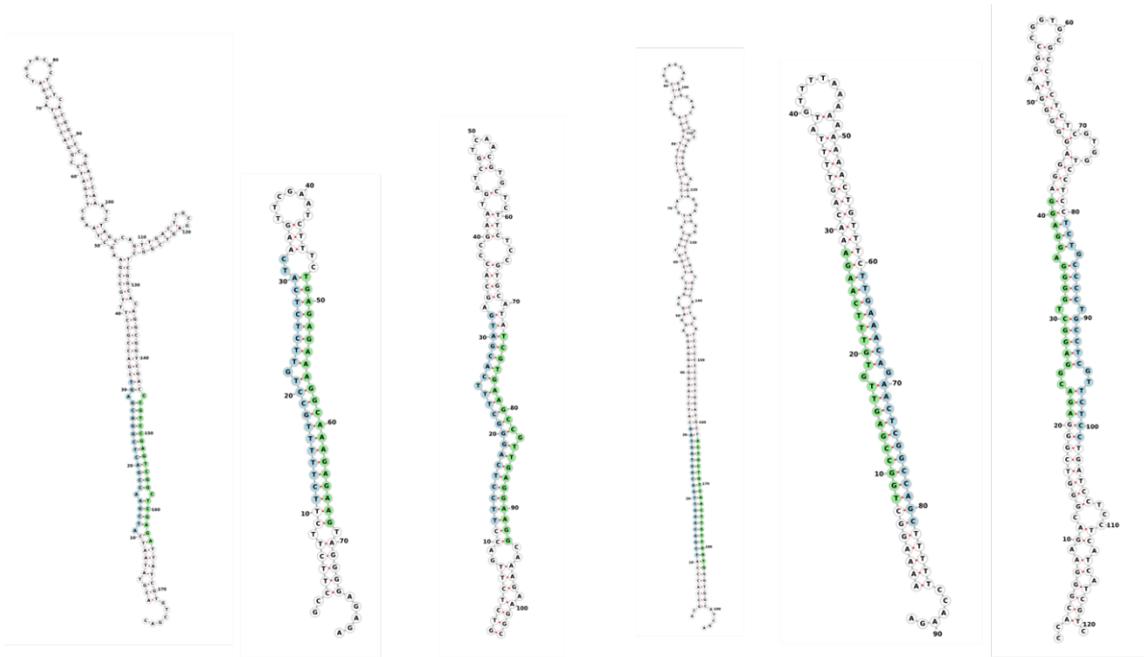
target 5' UUGGUC-AAUAGACCJUUAU 3'
      :: :::::::::::::::
query  3' URCAGUUUUUUGGUGAUA 5'
```

## Novel #24

```
query=chr07:1353404-1353488, target=GG22|c5693_g1_i1, score=4, range=228-248, strand=1
Annot: gn|BL_ORD_ID|278947 Q9SU13.1 RecName: Full=Fasciclin-like arabinogalactan protein 2; Flags: Precursor

target 5' GGGCGUCGACGACCUCAGCG 3'
      ::::: :::::::::::::::
query  3' CCUCGAGGCGUCUGGGGUCGA 5'
```

**Figura suplementar 2.** Exemplos de alinhamentos derivados do TargetFinder entre o novo miRNA de *M. acuminata* var. Calcutta 4 e os alvos gênicos putativos. Pontuações acima de 4 não foram consideradas



Novel 1

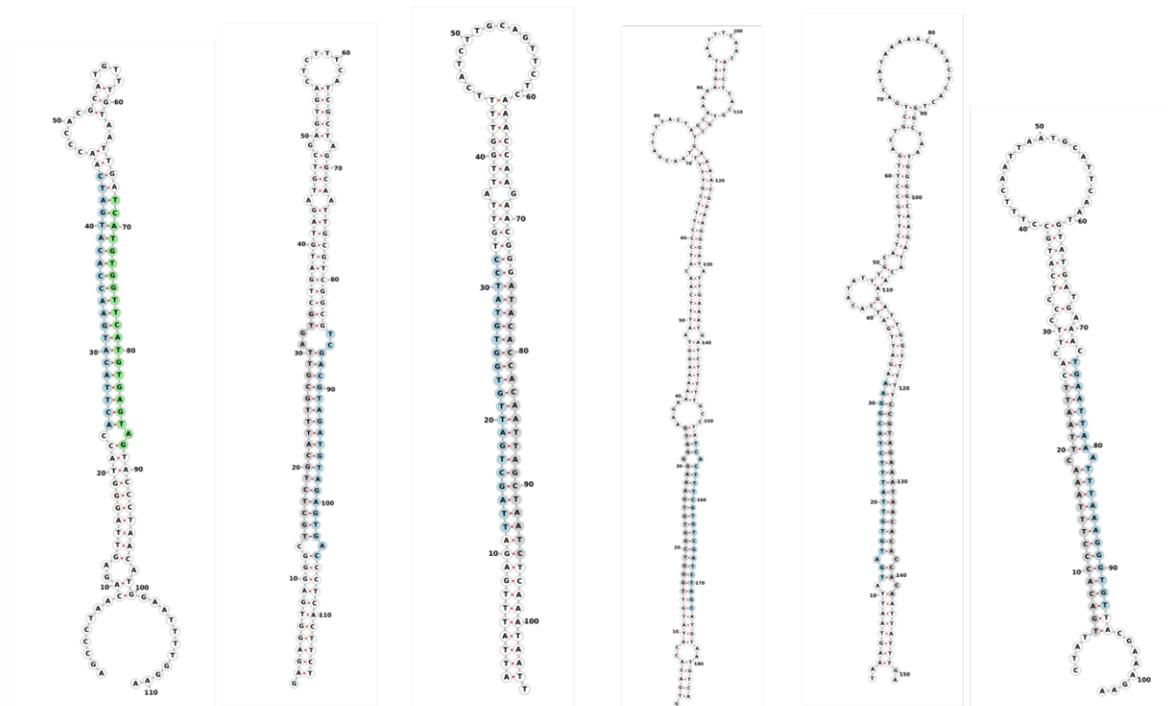
Novel 2

Novel 3

Novel 4

Novel 5

Novel 6



Novel 7

Novel 8

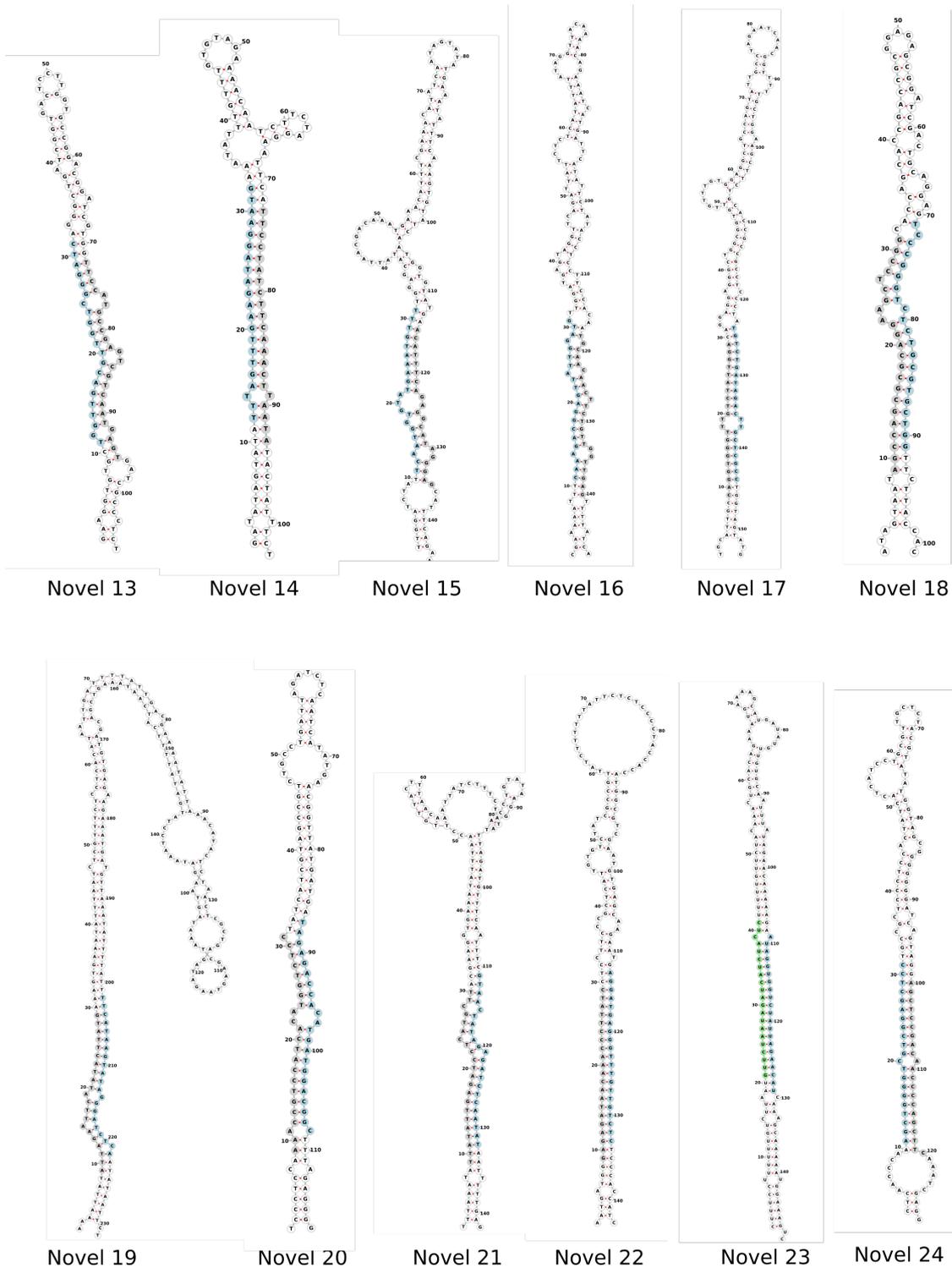
Novel 9

Novel 10

Novel 11

Novel 12

(Continua)



**Figura suplementar 1.** Predição de novas estruturas secundárias *hairpin* de miRNAs presentes em *M. acuminata* var. Calcutta 4. As estruturas secundárias foram determinadas usando o programa Forna. As sequências maduras estão marcadas em azul. E as sequências star estão marcadas em verde. Uma sequência putativa star possui marcação em cinza.

**Tabela suplementar 2.** Dados globais de expressão dos miRNAs presentes em *M. acuminata* var. Calcutta 4 em todos os pontos analisados.

ID	Locus	3DAI NI	3DAI I	12DAI NI	12DAI I
miR1432-5p	chr04:29804256-29804373	1155	1	938	2268
miR156a	chr07:31787075-31787250	16	1	9	13
miR156b-5p	chr04:28347364-28347472	989	1	1185	1387
miR156b-5p	chr04:6310506-6310591	13554	12	13181	13327
miR156b-5p	chr05:38171143-38171227	15450	28	14989	15055
miR156b-5p	chr07:13075607-13075689	15457	36	15023	15089
miR156b-5p	chr09:34802071-34802195	1707	6	1787	2114
miR156b-5p	chr10:32671029-32671113	15450	28	14989	15055
miR156e-5p	chr01:539633-539823	39570	79	44794	44760
miR156e-5p	chr01:6594027-6594130	39074	14	44214	44110
miR156e-5p	chr02:17873905-17874008	38577	44	43738	43542
miR156e-5p	chr02:24384423-24384545	36781	91	42093	41931
miR156e-5p	chr02:24387606-24387777	36526	45	41748	41599
miR156e-5p	chr02:25055317-25055429	36717	64	42069	41908
miR156e-5p	chr03:688774-688881	36162	38	41322	41267
miR156e-5p	chr04:1697052-1697155	38552	42	43786	43600
miR156e-5p	chr04:28322446-28322555	36776	88	42091	41931
miR156e-5p	chr04:9661485-9661775	38584	45	43737	43548
miR156e-5p	chr05:3211944-3212072	39278	61	44737	45279
miR156e-5p	chr06:4163266-4163419	1295	9	1713	1813
miR156e-5p	chr07:3883172-3883276	39122	75	44137	44020
miR156e-5p	chr08:2102934-2103048	36151	34	41321	41268
miR156e-5p	chr09:26030484-26030689	1582	4	1956	2089
miR156e-5p	chr09:8711968-8712151	38651	98	43910	43728
miR156e-5p	chr10:1508735-1508846	36779	90	42092	41929
miR156e-5p	chr10:6504494-6504603	38587	47	43745	43551
miR157b-5p	chr01:11906687-11906832	2443	50	2722	2683
miR157b-5p	chr03:32974932-32975029	2030	2	2419	2412
miR157b-5p	chr09:34202112-34202236	2441	50	2722	2684
miR157b-5p	chrUn_random:35600581-35600684	2441	50	2722	2683
miR159a-5p	chr04:10257583-10257807	250179	158	367444	320173
miR159a-5p	chr04:4808107-4808313	247515	325	364895	318086
miR159b-5p	chr07:10572823-10572981	32559	67	18868	12616
miR159b-5p	chr10:31494751-31494964	32588	90	18898	12630
miR159c-3p	chr04:2144238-2144404	913	8	1358	1349
miR159c-3p	chr06:5241994-5242185	839	1	1262	1259
miR159c-3p	chr10:35824033-35824270	923	9	1367	1359
miR160	chr01:14625791-14626020	52	3	30	32
miR160b-5p	chr02:14689973-14690093	716	9	431	393

miR160b-5p	chr03:28876582-28876714	801	2	494	448
miR160b-5p	chr05:279700-279806	230	5	239	203
miR160b-5p	chr05:39812041-39812223	796	6	496	446
miR160b-5p	chr07:5927466-5927575	778	8	486	444
miR160b-5p	chr08:4724289-4724393	798	9	493	446
miR160e-5p	chr01:127222-127329	7		16	7
miR160h	chr02:25384759-25384884	82	5	46	30
miR160h-3p	chr06:15246561-15246691	10		4	1
miR162a-5p	chr03:9218446-9218575	28687	55	30507	33745
miR162a-5p	chr04:4577899-4578062	28958	12	30747	33992
miR162a-5p	chr04:4587725-4587870	28960	12	30747	33992
miR162a-5p	chr04:8004642-8004782	9186	10	11427	13377
miR162a-5p	chr04:9841785-9841933	28962	11	30747	33994
miR162a-5p	chr09:35101417-35101583	28760	78	30573	33846
miR164b-5p	chr02:2062397-2062491	3897	13	2505	2496
miR164b-5p	chr03:7221815-7222013	4084	17	2612	2634
miR164b-5p	chr06:34594370-34594472	4141	14	2625	2656
miR164b-5p	chr06:920148-920244	4088	16	2614	2632
miR164b-5p	chr09:2887416-2887526	3961	15	2570	2552
miR164b-5p	chr11:25862710-25862802	753	9	420	373
miR164b-5p	chr11:4912164-4912261	598	2	366	304
miR164c-5p	chr05:10389500-10389614	2279	13	1558	1312
miR164c-5p	chr09:9352244-9352333	672	9	463	485
miR164c-5p	chr10:4747372-4747479	2285	16	1559	1314
miR166a-3p	chr09:37603214-37603330	81928	26	48296	43554
miR166a-5p	chr03:4862055-4862163	86189	59	50728	45158
miR166a-5p	chr05:4212809-4212913	81772	45	47763	43207
miR166c-5p	chr01:12208133-12208254	298839	193	334493	353306
miR166c-5p	chr01:6891762-6891867	305941	128	339411	357048
miR166c-5p	chr01:8665576-8665683	305851	116	339196	356801
miR166c-5p	chr02:20822450-20822589	302745	116	337064	355271
miR166c-5p	chr02:22003191-22003325	300371	151	335530	354201
miR166c-5p	chr03:9451370-9451463	305947	128	339414	357052
miR166c-5p	chr04:22616404-22616674	340546	120	374152	394779
miR166c-5p	chr04:25954943-25955041	304583	172	338341	355979
miR166c-5p	chr04:31657518-31657614	305977	190	339376	356945
miR166c-5p	chr04:33194549-33194692	305921	111	339408	357050
miR166c-5p	chr05:11174815-11174946	305917	110	339406	357045
miR166c-5p	chr05:9873882-9874015	300385	103	335783	354332
miR166c-5p	chr07:4286011-4286133	345778	170	377328	397104
miR166c-5p	chr09:14724448-14724567	298948	199	334611	353396
miR166c-5p	chr09:15246672-15246767	302778	143	337101	355304
miR166c-5p	chr09:34029225-34029338	338644	190	372431	393363
miR166e-3p	chr02:25442290-25442413	2735	19	2763	2543
miR167a-5p	chr01:5517875-5517966	172359	185	176977	203962
miR167a-5p	chr02:22555760-22555920	171526	148	176085	202982

miR167a-5p	chr02:22559226-22559343	6688	59	3877	4582
miR167a-5p	chr03:17273195-17273311	174809	178	178195	204882
miR167a-5p	chr03:30258088-30258197	172740	177	177132	204066
miR167a-5p	chr03:34119077-34119186	174778	136	178162	204847
miR167a-5p	chr04:33981570-33981688	6688	59	3877	4582
miR167a-5p	chr04:33984969-33985049	172182	174	176829	203825
miR167a-5p	chr04:7565292-7565393	172222	118	176870	203870
miR167a-5p	chr05:2034500-2034607	6808	14	3995	4724
miR167a-5p	chr06:27089086-27089218	6688	59	3877	4582
miR167a-5p	chr07:1097509-1097617	95	3	66	116
miR167a-5p	chr09:7003515-7003627	172180	173	176829	203825
miR167b-5p	chr04:26473679-26473821	12938	77	22311	22517
miR168b-5p	chr01:10328455-10328716	15164	19	19048	18152
miR168b-5p	chr01:13933987-13934079	20353	10	27093	24986
miR168b-5p	chr01:18741206-18741466	16368	16	20522	19535
miR168b-5p	chr03:10679639-10679721	19978	31	26687	24582
miR168b-5p	chr03:31836201-31836386	18594	97	25156	23144
miR168b-5p	chr04:4290459-4290550	17343	16	21759	20551
miR168b-5p	chr04:9373491-9373585	20135	97	26915	24745
miR168b-5p	chr07:16150312-16150403	3325	15	5890	4860
miR168b-5p	chr09:35428915-35429023	20510	88	27335	25153
miR169-5p	chr01:14078948-14079076	16	1	11	21
miR169-5p	chr09:826990-827128	3		0	0
miR169g	chr05:40655880-40655988	36	5	19	15
miR169l	chr05:22185924-22186038	1		0	0
miR169l-5p	chr06:1161846-1161951	4		2	0
miR169l-5p	chr08:899135-899242	4		1	0
miR171-5p	chr03:33962047-33962141	703	0	514	432
miR171-5p	chr04:7592204-7592289	702	0	514	432
miR171-5p	chr05:33030774-33030880	693	2	520	433
miR171-5p	chr05:39740610-39740718	306	4	125	115
miR171-5p	chr05:39740622-39740727	306	4	125	115
miR171-5p	chr08:3295783-3295874	30	5	35	57
miR171-5p	chr11:830904-831011	692	8	521	433
miR171a-5p	chr04:24458993-24459095	3643	16	2951	2717
miR171a-5p	chr04:32343733-32343828	3785	17	3073	2870
miR171a-5p	chr05:8176694-8176803	3638	16	2952	2717
miR171b-3p	chr09:33074374-33074465	15		9	6
miR171c-3p	chr01:8306745-8306826	6		10	4
miR171e-5p	chr02:23357801-23358024	28171	01	21412	24621
miR171e-5p	chr04:33571917-33572003	28340	44	21734	24945
miR171e-5p	chr04:36898947-36899034	28344	40	21734	24948
miR171e-5p	chr09:7589441-7589540	33890	22	26642	30597
miR171f-5p	chr01:285088-285169	4		2	2
miR171f-5p	chr04:28138309-28138411	106	1	88	85
miR171l-5p	chr08:33266823-33266926	10469	17	8626	10020

miR172-5p	chr03:10763013-10763112	16369	31	6417	5764
miR172-5p	chr11:24915318-24915519	15800	50	6118	5451
miR172a-5p	chr01:1264989-1265082	15806	50	6118	5451
miR172a-5p	chr01:13474914-13475114	330	53	6226	5549
miR172a-5p	chr02:17211606-17211839	338	58	6213	5534
miR172a-5p	chr03:24275979-24276094	313	57	6121	5454
miR172a-5p	chr03:31545720-31545796	792	58	6111	5447
miR172a-5p	chr05:33766739-33766922	305	50	6111	5464
miR172a-5p	chr06:22769113-22769222	313	57	6121	5454
miR172a-5p	chr07:3410269-3410422	329	30	6153	5504
miR172a-5p	chr09:28956165-28956363	311	71	6129	5462
miR172a-5p	chr09:35731354-35731442	300	54	6105	5446
miR172c-5p	chr05:29333324-29333433	2087	8	803	748
miR172e-3p	chr04:33020443-33020530	74	2	24	24
miR2118-5p	chr03:32968699-32968801	1885	3	2709	3399
miR319-5p	chr11:24138156-24138268	17		3	2
miR319c-5p	chr07:6212243-6212342	167	8	178	185
miR319d-5p	chr04:2144275-2144366	8		16	12
miR390a-5p	chr01:25087338-25087429	60	5	29	39
miR390a-5p	chr05:10337735-10337897	62	5	45	45
miR390a-5p	chr07:31334978-31335066	48	7	20	33
miR390a-5p	chr11:25976484-25976572	1535	1	876	846
miR390a-5p	chr11:6340592-6340680	61	5	37	40
miR391-5p	chr05:6014360-6014471	4082	75	4547	3741
miR391-5p	chr08:27723893-27724048	96	9	79	64
miR393a-5p	chr03:24194512-24194596	222	4	214	154
miR393b-5p	chr02:17070694-17070797	3637	25	3737	3074
miR393b-5p	chr04:3352232-3352322	3871	32	3963	3248
miR393b-5p	chr04:8535028-8535117	3703	55	3763	3112
miR393b-5p	chr05:41296286-41296405	180	6	190	141
miR393b-5p	chr09:29541296-29541569	3635	26	3747	3074
miR395a-3p	chr08:37977254-37977360	149	3	132	288
miR395a-5p	chr06:3217240-3217339	149	4	133	289
miR395a-5p	chr06:3217482-3217560	151	7	133	304
miR396a-5p	chr01:1573387-1573501	86334	54	62027	60115
miR396a-5p	chr01:16470117-16470216	58569	12	23682	20949
miR396a-5p	chr01:407106-407196	432	2	345	456
miR396a-5p	chr01:7957883-7958058	72126	79	49357	46972
miR396a-5p	chr01:7960407-7960531	4451	36	2520	2452
miR396a-5p	chr03:14715639-14715821	86388	75	62081	60147
miR396a-5p	chr03:9906850-9907135	58522	29106	23660	20934
miR396a-5p	chr04:28239420-28239506	20986	14498	11577	11093
miR396a-5p	chr04:28244798-28244895	58428	29039	23613	20895
miR396a-5p	chr06:3459867-3459963	58414	29012	23582	20822
miR396a-5p	chr06:36202082-36202196	59265	29609	24055	21231
miR396a-5p	chr06:36208056-36208143	58483	29085	23649	20914

miR396a-5p	chr07:23720220-23720490	436	364	346	457
miR396a-5p	chr09:38531243-38531335	62255	31343	25876	22556
miR396b-5p	chr06:36205871-36205982	20434	14154	11272	10881
miR396b-5p	chr09:5874092-5874202	20432	14154	11272	10881
miR396b-5p	chr10:18905329-18905407	19898	13774	10942	10549
miR397a-5p	chr02:16278612-16278894	2585	3426	8961	6672
miR398a-5p	chr11:21353880-21353998	2670	4210	11267	7245
miR399b-3p	chr09:39877967-39878076	15	44	9	9
miR408b-5p	chr08:4102073-4102178	5339	5840	14792	12747
miR482b-5p	chr09:34223218-34223319	13594	7894	18867	16775
miR528-5p	chr08:10814996-10815086	7941	6724	29053	19250
miR529-5p	chr02:18489294-18489388	6	7	4	11
miR529-5p	chr06:30947642-30947730	6	7	4	11
miR529b-5p	chr06:18041891-18041994	10	12	14	51
miR529b-5p	chr08:17886965-17887069	10	12	14	51
miR530a-5p	chr05:8886985-8887230	2112	704	849	639
miR535a-5p	chr06:30736366-30736528	90508	44964	83845	86651
miR535a-5p	chr06:5739325-5739429	97878	49239	88222	90017
miR535a-5p	chr08:259015-259119	98258	49482	88654	90352
miR535a-5p	chr08:40640859-40640962	90448	44853	83867	86662
miR535a-5p	chr09:40304598-40304795	97968	49290	88307	90108
miR535a-5p	chr09:4414748-4414851	90631	44909	83965	86689
miR535a-5p	chr10:35694300-35694402	92573	46386	86007	88895
miR535d-5p	chr03:25564695-25564802	23897	12885	33094	31458
miR827-5p	chr10:28130905-28131200	6123	8426	8850	7192
Novel_1	chr01:7155057-7155266	6	2	9	5
Novel_2	chr05:5132735-5132813	3	3	6	13
Novel_3	chr07:20901036-20901267	649	564	2751	2197
Novel_4	chr08:3639255-3639448	4	3	7	4
Novel_5	chr10:34402590-34402681	30	12	43	36
Novel_6	chr09:11246782-11246863	51	15	41	36
Novel_7	chr09:34735640-34735819	1049	602	954	1042
Novel-3p_10	chr02:15328566-15328749	0	4	1	2
Novel-3p_17	chr08:39270564-39270717	2	0	0	2
Novel-3p_18	chr09:4039767-4039867	1	1	4	3
Novel-3p_19	chr09:40438631-40438862	1	0	0	3
Novel-3p_20	chr10:26852029-26852146	1	1	0	1
Novel-3p_21	chr11:2322440-2322581	3	0	0	0
Novel-3p_22	chr11:5710224-5710366	24	6	2	3
Novel-3p_23	chr07:33555721-33555990	1534	1074	2066	1760
Novel-3p_24	chr07:1353404-1353488	17	10	15	4
Novel-5p_11	chr02:22236894-22237044	3	2	5	3
Novel-5p_12	chr02:27471405-27471507	0	4	0	2
Novel-5p_13	chr04:10607231-10607336	1	1	2	1
Novel-5p_14	chr04:30762245-30762347	2	2	0	1
Novel-5p_15	chr05:22232500-22232644	0	3	1	1

---

Novel-5p_16	chr05:25109802-25109949	3	0	0	0
Novel-5p_8	chr01:3237626-3237740	3	1	4	3
Novel-5p_9	chr01:7762935-7763039	58	43	42	25

---

**Tabela complementar 3.** Dados de expressão diferencial dos miRNAs presentes em *Musa acuminata* var. Calcutta 4 em relação ao controle não inoculado, juntamente com genes-alvo. Os valores de Log2FC e FDR foram gerados nos resultados de EdgeR.

Locus	miRNA	log2FC_EdgeR_3DAI	FDR_EdgeR_3DAI	log2FC_EdgeR_12DAI	FDR_EdgeR_12DAI	Target	Score	logFC_3DAI	FDR_3DAI	logFC_12DAI	FDR_12DAI	Product
chr04:29804256-29804373	miR1432	-0,283313794	1	-0,279557997	1	Ma05_g06390	4	-2,703446628	0,014002288	0,234770736	0,896025034	uncharacterized LOC103984114
chr04:28347373-28347539	miR156b	0,097345101	1	0,299854085	1	Ma03_g28770	2	-0,256937733	0,689739751	-0,363605318	0,805560653	squamosa promoter-binding-like protein 12
chr07:13075607-13075689	miR156b	-0,262703176	1	0,092193155	1	Ma09_g28300	1	1,277005315	0,082171326	-0,838305487	0,799263431	squamosa promoter-binding-like protein 14
chr01:539633-539823	miR156e	-0,165084028	1	0,086702858	1	Ma04_g01370	1	-2,294009171	0,082313447	1,227643656	0,799263431	squamosa promoter-binding-like protein 14
chr03:688774-688881	miR156e	-0,181643819	1	0,087632349	1	Ma09_g28300	1	1,277005315	0,082171326	-0,838305487	0,799263431	squamosa promoter-binding-like protein 14
chr09:26030484-26030689	miR156e	-0,204209828	1	0,185361596	1	Ma03_g28770	1	-0,169716487	0,999863133	-0,191968214	0,815587112	squamosa promoter-binding-like protein 12
chr07:31787075-31787250	miR156j	-2,943760008	1	0,599907278	1	Ma03_g28770	2	-0,256937733	0,689739751	-0,363605318	0,805560653	squamosa promoter-binding-like protein 12
chr03:32974932-32975029	miR157b	-0,305881631	1	0,070134748	1	Ma08_g24570	2	0,374313277	0,521674266	0,597918871	0,799263431	squamosa promoter-binding-like protein 12
chr04:4808076-4808306	miR159a	0,231422107	1	-0,122747376	1	Ma01_g10440	3,5	-0,100826516	0,999863133	0,078484277	0,928742913	transcription factor GAMYB-like, transcript variant X2
chr07:10572823-10572981	miR159b	-0,286138936	1	-0,483224071	1	Ma01_g10440	3	-0,170851817	0,18145256	0,169961545	0,892482137	transcription factor GAMYB-like, transcript variant X2
chr05:279706-279795	miR160b	-0,514102288	1	-0,134272515	1	Ma04_g18800	2			0,18587347	0,805666446	auxin response factor 18
chr07:5927466-5927575	miR160b	-0,800484352	0,085785453	-0,028112378	1	Ma05_g14540	1	-1,145290415	0,055947929	0,09775738	0,947908845	auxin response factor 18
chr01:127222-127329	miR160e	1,040381615	1	-1,104065078	1	Ma05_g14540	2	-1,145290415	0,055947929	0,09775738	0,947908845	auxin response factor 18
chr01:14625791-14626020	miR160h	-0,244684714	1	0,149471639	1	Ma05_g14540	1	-1,145290415	0,055947929	0,09775738	0,947908845	auxin response factor 18
chr02:25384759-25384884	miR160h	-0,910833674	1	-0,518330885	1	Ma05_g03730	1	0,570409264	0,315318573	0,081879719	0,954554333	auxin response factor 18
chr06:15246561-15246691	miR160h	-0,553812687	1	-1,615763706	1	Ma05_g14540	3	-1,145290415	0,055947929	0,09775738	0,947908845	auxin response factor 18
chr04:8004642-8004782	miR162a	0,3896693	1	0,285245906	1	Ma04_g10380	1	-1,635946685	0,098867317	-1,033158244	0,799263431	UDP-glycosyltransferase 88A1-like
chr09:35101417-35101583	miR162a	0,352194692	1	0,219622748	1	Ma04_g10370	0	-0,756813259	0,29374295	-0,473267607	0,799263431	anthocyanidin 5,3-O-glucosyltransferase-like
chr06:34594370-34594472	miR164b	-0,499147987	0,755452295	0,131184183	1	Ma05_g29000	3,5	1,693	0,093973568	0,332490874	0,820492365	NAC domain-containing protein 21/22
chr11:4912150-4912250	miR164b	-0,16710811	1	-0,185493302	1	Ma02_g21420	3	0,361496433	0,999863133	0,573122527	0,753475129	inositol-pentakisphosphate 2-kinase-like
chr09:9352244-9352333	miR164c	-0,355682575	1	0,162635336	1	Ma11_g24070	3	1,230496782	0,230045793	0,50032726	0,810589924	probable alpha-glucosidase
chr10:4747372-4747479	miR164c	0,053161655	1	-0,193485647	1	Ma08_g25810	4	-1,315963508	0,068211783	-0,265147444	0,844838359	probable indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.5
chr05:4212809-4212913	miR166a	-0,506395308	0,291844479	-0,047334596	1	Ma02_g14880	3	0,263876025	0,999863133	1,573457322	0,772431489	homeobox-leucine zipper protein HOX32-like
chr09:34029225-34029338	miR166c	-0,147708603	1	0,153674924	1	Ma07_g28220	3	1,058871399	0,048038717	-0,020021466	0,99517399	probable 6-phosphogluconolactonase 1
chr02:25442290-25442413	miR166e	0,032692409	1	-0,041809975	1	Ma04_g38190	1	-0,015298749	0,984456842	0,546406153	0,799263431	homeobox-leucine zipper protein HOX32-like
chr04:33981570-33981688	miR167a	-0,249788302	1	0,305941229	1	Ma11_g01530	0	1,62911191	0,016747731	1,320069583	0,799263431	auxin response factor 12-like
chr05:2034500-2034607	miR167a	-0,238993833	1	0,306757248	1	Ma11_g01530	0	1,62911191	0,016747731	1,320069583	0,799263431	auxin response factor 12-like
chr07:1097509-1097617	miR167a	0,020225845	1	0,876419237	1	Ma04_g10650	0	-0,281567806	0,721489475	-0,545576087	0,799263431	1,2-di-hydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase 1-like, transcript variant X2
chr09:7003515-7003627	miR167a	0,037038038	1	0,270349853	1	Ma04_g10650	0	-0,281567806	0,721489475	-0,545576087	0,799263431	1,2-di-hydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase 1-like, transcript variant X2
chr04:26473679-26473821	miR167b	0,07226593	1	0,065640714	1	Ma11_g01530	1	1,62911191	0,016747731	1,320069583	0,799263431	auxin response factor 12-like
chr04:4290459-4290550	miR168b	-0,085268254	1	-0,011794103	1	Ma00_g00420	4	-1,22769578	0,047638181	0,041176333	0,973693039	protein argonaute 1B
chr07:16150312-16150403	miR168b	-0,125642191	1	-0,156888196	1	Ma06_g27460	4	-2,277543667	0,010665857	-0,08602296	0,956150225	U-box domain-containing protein 25-like
chr01:14078948-14079076	miR169	1,139188866	1	0,978911787	1	Ma05_g05130	4	1,331015567	0,133827082	-0,064885104	0,980071794	RNA-binding protein 38-like
chr05:40655880-40655988	miR169d	0,231799888	1	-0,271995631	1							
chr05:22185924-22186038	miR169l	1,389272115	1	0	0	Ma04_g11070	3	1,815969045	0,026166278	-0,062034019	0,964929078	nuclear transcription factor Y subunit A-4-like
chr06:1161841-1161940	miR169l	0,713283277	1	-2,652133889	1	Ma03_g30940	3	0,166676473	0,836223925	0,242532634	0,835672483	nuclear transcription factor Y subunit A-4-like
chr05:39740610-39740718	miR171	-0,153901924	1	-0,030018199	1	Ma11_g08370	4	-1,813207271	0,376982346	0,263171056	0,958498657	proline transporter 2-like
chr08:3295783-3295874	miR171	1,350678133	0,302516522	0,753734631	1	Ma04_g25650	2			0,736985495	0,753475129	scarecrow-like protein 6
chr11:830904-831011	miR171	-0,001099122	1	-0,178382858	1	Ma05_g23270	1	-1,155604231	0,122613193	0,39308125	0,850184825	scarecrow-like protein 27
chr05:8176694-8176803	miR171a	-0,225265146	1	-0,040384145	1	Ma06_g38750	0	1,340437398	0,122536854	0,564223211	0,807852982	scarecrow-like protein 6
chr09:33074374-33074465	miR171b	-0,14380684	1	-0,93891671	1							
chr01:8306745-8306826	miR171c	0,471371828	1	-1,182035965	1	Ma07_g06770	1	0,310284694	0,788848853	0,827979131	0,799263431	scarecrow-like protein 6
chr09:7589441-7589540	miR171e	-0,019960475	1	0,285082754	1	Ma06_g38750	2,5	1,340437398	0,122536854	0,564223211	0,807852982	scarecrow-like protein 6
chr01:285088-285169	miR171f	-0,214164249	1	0,055069597	1	Ma04_g25650	2	-0,698512325	0,383480559	0,775735888	0,800606179	scarecrow-like protein 6
chr04:28138309-28138411	miR171f	-0,278403486	1	0,02341344	1	Ma04_g25650	1,5	-0,698512325	0,383480559	0,775735888	0,800606179	scarecrow-like protein 6
chr08:33266823-33266926	miR171l	0,013875074	1	0,29543833	1							
chr03:24275979-24276094	miR172a	-0,446179253	0,911292503	-0,119092961	1	Ma04_g06130	2	2,208804877	0,016028311	0,52413695	0,805560653	floral homeotic protein APETALA 2-like
chr05:29333324-29333433	miR172c	-0,33579141	1	-0,046048427	1	Ma09_g04220	2	-1,433988766	0,06098244	-0,61561636	0,800606179	floral homeotic protein APETALA 2-like
chr04:33020443-33020530	miR172e	-0,438034619	1	0,065004986	1	Ma03_g16590	0,5	0,546293136	0,266800701	0,424753399	0,799263431	auxin-responsive protein IAA6-like
chr03:32968699-32968801	miR2118	-0,255014122	1	0,377675389	1	Ma05_g11770	3,5	-1,281624806	0,244515522	-0,003300055	0,998797627	disease resistance protein RPS2
chr11:24138156-24138268	miR319	-1,66928102	1	-0,42417046	1	Ma02_g09210	3,5	-1,468640414	0,017677054	-0,61278487	0,839084398	ethylene-responsive transcription factor 1-like
chr02:24212499-24212689	miR319a	0,479486189	1	0,088355315	1	Ma03_g32580	4	1,459599943	0,044297152	1,665451408	0,799263431	transcription factor TCP4-like

chr07:6212243-6212342	miR319c	0,141937164		1	0,115880276	1	Ma03_g32580	3	1,459599943	0,044297152	1,665451408	0,799263431	transcription factor TCP4-like
chr04:21442171-21442311	miR319d	2,601232418		1	2,704466164	1	Ma10_g14610	4			1,290259244	0,798814837	hydroquinone glucosyltransferase
chr05:10337735-10337897	miR390a	-0,03172414		1	0,081281458	1	Ma04_g39340	3	-1,824749424	0,063530535	-0,212851432	0,919996409	leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine-protein kinase
chr11:25976484-25976572	miR390a	-0,523288473		1	0,03525005	1	Ma01_g11010	3	-0,021267861	0,999863133	-0,058357677	0,939276744	DNA-binding protein RHL1
chr05:6014360-6014471	miR391	-0,183828672		1	-0,223629833	1							
chr08:27723893-27724048	miR391	-0,567163106		1	-0,220913456	1	Ma01_g00140	3,5	-0,351758739	0,436703307	0,253894372	0,850276945	pentatricopeptide repeat-containing protein
chr04:8535028-8535117	miR393b	0,260423263		1	-0,238203161	1	Ma06_g18000	2	1,606669643	0,027321793	0,139141775	0,916216925	transport inhibitor response 1-like protein
chr05:41296286-41296405	miR393b	0,261284847		1	-0,37554351	1	Ma05_g29320	1	0,35156037	0,549394135	-0,285766914	0,854603421	transport inhibitor response 1-like protein
chr06:3217482-3217560	miR395a	1,008963715	0,046866221		0,04891282	1	Ma01_g05840	1	0,006444401	0,999863133	0,391642489	0,753475129	sulfate transporter 2.1
chr01:1573397-1573568	miR396a	-0,276870648		1	0,028876638	1	Ma01_g15340	1	0,976856196	0,999863133	1,693076217	0,753475129	growth-regulating factor 1-like
chr01:407106-407196	miR396a	0,480718466		1	0,450371555	1	Ma01_g15340	2	1,045910281	0,685025146	1,243152241	0,815593567	growth-regulating factor 1-like
chr01:7960407-7960531	miR396a	-0,289509498		1	0,045120158	1	Ma04_g26950	2	-0,085441142	0,910165109	-0,506007518	0,799263431	growth-regulating factor 7-like
chr06:3459875-3459954	miR396a	-0,265177319		1	-0,1093019	1	Ma03_g24590	3,5					alpha-glucosidase
chr09:5874070-5874199	miR396b	0,204720534		1	0,009011874	1	Ma04_g26950	0	0,030071781	0,999863133	0,518840087	0,753475129	signal peptidase complex subunit 3B-like
chr02:16278612-16278894	miR397a	0,974912546	8,45E-06		-0,398993314	1	Ma03_g12850	4	-0,170579756	0,87312993	0,836529989	0,799263431	pentatricopeptide repeat-containing protein
chr11:21353880-21353998	miR398a	1,274740732	7,69E-11		-0,567731803	1	Ma07_g23780	3,5	1,56642307	0,076209298	0,665155013	0,799263431	F-box/LRR-repeat protein 3-like
chr09:39877967-39878076	miR399b	2,223759742	0,001287741		0,040991171	1	Ma08_g07240	4					G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase B120
chr08:4102073-4102178	miR408b	0,737720439	0,002730221		1,291738969	1	Ma11_g05520	3,5	0,873398798	0,328951988	1,439831986	0,799263431	putative serine/threonine-protein kinase
chr09:34223218-34223319	miR482b	-0,04119819		1	-0,072035069	1							
chr08:10814996-10815086	miR528	0,366400435		1	-0,509915626	1	Ma08_g34740	2,5	-4,176252666	0,018125896	-0,391782697	0,900277909	polyphenol oxidase chloroplastic-like
chr02:18489294-18489388	miR529	0,957730161		1	1,417750571	1	Ma04_g03420	3,5	1,756008761	0,087591918	1,841725376	0,799263431	zinc finger protein ZAT4-like
chr06:18041891-18041994	miR529b	1,013850705		1	1,868662174	1	Ma04_g01370	1	-2,294009171	0,082313447	1,227643656	0,799263431	squamosa promoter-binding-like protein 14
chr05:8886985-8887230	miR530a	-0,762944687	0,019136172		-0,363166055	1	Ma10_g14410	4	1,693342934	0,093973568	1,705742226	0,799263431	60S ribosomal protein L26-2
chr08:40640859-40640962	miR535a	-0,292970067		1	0,139486968	1	Ma09_g23570	4	0,34799922	0,561226398	0,162088704	0,893906691	squamosa promoter-binding-like protein 12
chr03:25564695-25564802	miR535d	-0,174600005		1	0,034048866	1	Ma08_g07960	3	0,714394231	0,192033771	0,162607508	0,896392178	30S ribosomal protein S17
chr10:28130905-28131200	miR827	1,254825991	1,78E-11		-0,257431692	1	Ma04_g03420	4	1,756008761	0,087591918	1,841725376	0,799263431	zinc finger protein ZAT4-like
chr01:7155057-7155266	Novel_1	-0,744304987		1	-0,711679353	1	Ma10_g12830	3,5	-0,87258875	0,141671944	-0,033494256	0,99283775	probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 26b
chr05:5132735-5132813	Novel_2	0,649808507		1	1,108697273	1	Ma06_g01920	4	0,178062835	0,921886248	0,822235196	0,799263431	pollen-specific leucine-rich repeat extensin-like protein 3
chr07:20901036-20901267	Novel_3	0,507636337		1	-0,250254632	1	Ma03_g19710	3,5	-0,102890791	0,999863133	0,059272526	0,938312172	interferon-related developmental regulator 1-like
chr08:3639196-3639285	Novel_4	1,056427061		1	-1,139789555	1	Ma08_g05300	0	0,191314167	0,999863133	-0,17829294	0,793756773	uncharacterized LOC103993778
chr10:34402590-34402681	Novel_5	-0,584696257		1	-0,188289948	1	Ma03_g17480	3,5	0,852935884	0,099889911	-0,328260153	0,805326857	F-box/kelch-repeat protein-like
chr09:11246782-11246863	Novel_6	-1,002421309		1	-0,089847167	1	Ma11_g02750	3	0,194261416	0,785973323	-0,49361371	0,800606179	desumoylating isopeptidase 2-like, transcript variant X2
chr09:34735640-34735819	Novel_7	-0,034848982		1	0,160471307	1	Ma09_g03190	4	-2,959978589	0,028655115	-0,684636233	0,846598594	zinc finger protein ZAT11-like
chr02:15328566-15328749	Novel-3p_10	3,935518302		1	0,831576049	1	Ma03_g23810	3	0,192415401	0,774306799	-0,336334368	0,805445448	60S ribosomal protein L10a-1
chr08:39270564-39270717	Novel-3p_17	-2,393129891		1	2,691430796	1	Ma08_g26830	0	-1,523269256	0,139452336	-1,18159604	0,799263431	Putative peroxidase-25
chr09:4039767-4039867	Novel-3p_18	0,56788718		1	-0,280405939	1	Ma02_g14880	0	0,814625155	0,838609287	0,845381229	0,904222443	Homeobox-leucine zipper protein
chr09:40438631-40438862	Novel-3p_19	-1,658086349		1	3,214393001	1	Ma10_g17540	3,5	-0,232343233	0,695713487	-0,415605829	0,800606179	subtilisin-like protease SBT5.4
chr10:26852029-26852146	Novel-3p_20	0,56788718		1	1,888284732	1	Ma05_g00680	3,5	-0,072472365	0,964948832	0,355035709	0,865596256	glutamate receptor 3.5-like
chr11:2322440-2322581	Novel-3p_21	-2,898861945		1	0	1	Ma10_g17200	0,5	-0,164638406	0,84019615	0,461526425	0,800606179	galacturonosyltransferase 8-like
chr11:5710224-5710366	Novel-3p_22	-1,195092004		1	0,550289136	1	Ma10_g17200	0,5	-0,164638406	0,84019615	0,461526425	0,800606179	galacturonosyltransferase 8-like
chr07:33555721-33555990	Novel-3p_23	0,211064631		1	-0,198780856	1	Ma00_g00570	4	-1,157004571	0,310181827	0,26757656	0,861830415	probable apyrase 7
chr07:1353404-1353488	Novel-3p_24	-0,000580332		1	-1,731643045	1	Ma04_g09220	4	-0,275811279	0,655320013	-0,061773104	0,952367314	serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform-like
chr02:22236894-22237044	Novel-5p_11	0,135853602		1	-0,636814727	1	Ma02_g14090	0	0,661861972	0,224233936	-0,273835162	0,821485791	protein disulfide-isomerase LQY1
chr02:27471405-27471507	Novel-5p_12	3,96185393		1	2,671235037	1	Ma06_g15820	4	-1,459792529	0,039426058	-0,330955565	0,809647375	long chain acyl-CoA synthetase 4-like
chr04:10607231-10607336	Novel-5p_13	0,519951038		1	-0,750216658	1	Ma10_g27290	2,5	-0,828558827	0,999863133			G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase B120
chr04:30762239-30762336	Novel-5p_14	0,671378091		1	1,902458439	1	Ma07_g06930	3,5	1,205888504	0,058217837	-0,837360989	0,799263431	transcription factor MYB1R1-like
chr05:22232500-22232644	Novel-5p_15	3,550014061		1	0,042894012	1	Ma03_g23220	3	-0,594048562	0,615245208	0,524743559	0,803575734	Putative disease resistance protein RGA1
chr05:25109802-25109949	Novel-5p_16	-2,916658382		1	0	1	Ma04_g32660	4	-3,689363827	0,008732919	-0,549424916	0,803575734	ethylene-responsive transcription factor ERF054-like
chr01:3237626-3237740	Novel-5p_8	-0,675258071		1	-0,313276605	1	Ma10_g17200	2	-0,164638406	0,84019615	0,461526425	0,800606179	galacturonosyltransferase 8-like
chr01:7762935-7763039	Novel-5p_9	0,310035211		1	-0,686015675	1	Ma11_g14010	3,5	0,012793142	0,984957935	-0,122722063	0,901152947	ribulose-phosphate 3-epimerase

**Tabela suplementar 4.** Informações de todas as sequências dos miRNAs conservados em *Musa*.

miRNA	Sequence-5p	Sequence-3p	Coordinate	Length of mature miRNA	Pre_miRNA length (by mireap)	Total counts	Shortstack classification
miR390a-5p	CGCTATCTATCCTGAGTTTCA	CGCTATCTATCCTGAGTTTCA	chr11:25976484-25976572	21	135	1154553	Y
miR2118-5p	TTGCCGATCCCTCCCATGCCGA	TTGCCGATCCCTCCCATGCCGA	chr03:32968699-32968801	21	103	8956	Y
miR319-5p	CATGACTAGGAATATGATATC	CATCCTATTTCTAGCCATGTG	chr11:24138156-24138268	21	113	25	Y
miR166a-3p	TCGGACCAGGCTTCATTCCCTC		chr09:37603214-37603330	21	117	208204	N15
miR166a-5p	TCGGACCAGGCTTCATTCCCTC	TCGGACCAGGCTTCATTCCCTC	chr03:4862055-4862163	21	109	219634	Y
miR166a-5p	TCGGACCAGGCTTCATTCCCTC	TCGGACCAGGCTTCATTCCCTC	chr05:4212809-4212913	21	103	11137	Y
miR166c-5p	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	chr01:12208133-12208254	21	122	1150231	Y
miR166c-5p	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	chr02:20822450-20822589	21	140	1161396	Y
miR166c-5p	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	chr03:9451370-9451463	21	94	1170641	Y
miR166c-5p	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	chr04:33194549-33194692	21	144	1170590	Y
miR166c-5p	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	chr05:11174815-11174946	21	132	1170578	Y
miR166c-5p	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	chr07:4286011-4286133	21	123	1309080	Y
miR166c-5p	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	chr09:34029225-34029338	21	114	1288628	Y
miR166c-5p	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	chr01:6891762-6891867	21	106	1170628	Y
miR166c-5p	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	chr01:8665576-8665683	21	108	1170064	Y
miR166c-5p	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	chr02:22003191-22003325	21	96	11715	Y
miR166c-5p	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	chr04:22616404-22616674	21	271	1294697	Y
miR166c-5p	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	chr04:25954943-25955041	21	99	1166375	Y
miR166c-5p	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	chr04:31657518-31657614	21	97	1170588	Y
miR166c-5p	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	chr05:9873882-9874015	21	134	1154903	Y
miR166c-5p	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	chr09:14724448-14724567	21	120	1150554	Y
miR166c-5p	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	chr09:15246672-15246767	21	96	1161526	Y
miR166e-3p	TCGGACCAGGCTTCATTCCA	TCGGACCAGGCTTCATTCCA	chr02:25442290-25442413	21	124	9710	N15

miR390a-5p	AAGCTCAGGAGGGATAGCGCC	CGCTATCTATCCTGAGTTCCA	chr01:25087338-25087429	21	92	153	Y
miR390a-5p	AAGCTCAGGAGGGATAGCGCC	CGCTATCTATCCTGAGTTCTA	chr05:10337735-10337897	21	163	188	Y
miR390a-5p	AAGCTCAGGAGGGATAGCGCC	CGCTATCTATCCTGAGCTTCA	chr07:31334978-31335066	21	89	128	Y
miR390a-5p	AAGCTCAGGAGGGATAGCGCC	CGCTATCCATCCTGAGCTTCA	chr11:6340592-6340680	21	89	174	Y
miR162a-5p	TCGATAAACCTCTGCATCCGG	TCGATAAACCTCTGCATCCGG	chr03:9218446-9218575	21	130	115094	Y
miR162a-5p	TCGATAAACCTCTGCATCCAG	TCGATAAACCTCTGCATCCAG	chr04:8004642-8004782	21	141	41330	Y
miR162a-5p	TCGATAAACCTCTGCATCCGG	TCGATAAACCTCTGCATCCGG	chr04:9841785-9841933	21	149	116014	Y
miR162a-5p	TCGATAAACCTCTGCATCCGG	TCGATAAACCTCTGCATCCGG	chr09:35101417-35101583	21	167	115357	Y
miR162a-5p	TCGATAAACCTCTGCATCCGG	TCGATAAACCTCTGCATCCGG	chr04:4577899-4578062	21	164	116009	Y
miR162a-5p	TCGATAAACCTCTGCATCCGG	TCGATAAACCTCTGCATCCGG	chr04:4587725-4587870	21	146	116011	Y
miR319d-5p	TGCCGACTCATTCAATCAAAC	ATGAGTGAATGATGCGGGAGA	chr04:2144275-2144366	21	92	45	Y
miR159a-5p	TTTGGATTGAAGGGAGCTCTA	GAGCTCCTTGAAGTCCAAAGG	chr04:10257583-10257807	21	225	1111254	Y
miR159a-5p	TTTGGATTGAAGGGAGCTCTA	GAGCTCCTTGAAGTCCAAAGA	chr04:4808107-4808313	21	207	1102321	Y
miR159b-5p	CTTGGATTGAAGGGAGCTCC	CTTGGATTGAAGGGAGCTCC	chr07:10572823-10572981	20	159	79510	Y
miR159b-5p	CTTGGATTGAAGGGAGCTCC	CTTGGATTGAAGGGAGCTCC	chr10:31494751-31494964	20	214	79606	Y
miR159c-3p	CTTGGACTGAAGGGAGCTCCC	CTTGGACTGAAGGGAGCTCCC	chr04:2144238-2144404	22	167	4358	N15
miR159c-3p	CTTGGACTGAAGGGAGCTCCC		chr06:5241994-5242185	21	192	4041	N15
miR159c-3p	CTTGGACTGAAGGGAGCTCCC	CTTGGACTGAAGGGAGCTCCC	chr10:35824033-35824270	22	238	4388	N15
miR535d-5p	TGACGACGAGAGAGACACGC	GTGCTCTTCTCGTTGTCACC	chr03:25564695-25564802	21	108	101334	Y
miR530a-5p	TGCATTTGCACCTGCACCTAA	AGGTGCAGCGCAAATGCAAC	chr05:8886985-8887230	21	246	4304	Y
miR395a-3p	TGAAGTGTTTGGGGGAACTC	TGAAGTGTTTGGGGGAACTC	chr08:37977254-37977360	20	107	752	N15
miR395a-5p	TGAAGTGTTTGGGGGAACTC	TGAAGTGTTTGGGGGAACTC	chr06:3217240-3217339	21	100	755	Y
miR395a-5p	TGAAGTGTTTGGGGGAACTC	TGAAGTGTTTGGGGGAACTC	chr06:3217482-3217560	21	184	34140	Y
miR399b-3p	TGCCAAAGGAGAATTGCCCTG	TGCCAAAGGAGAATTGCCCTG	chr09:39877967-39878076	21	110	77	N15
miR391-5p	TTCGCAGGAGAGATGATGCCGCT	CGGTATCATCTACTGCGGAGG	chr08:27723893-27724048	23	156	278	Y
miR397a-5p	TTGAGTGCAGCGTTGATGAGA	TCACCAACGCTGCACCCAATA	chr02:16278612-16278894	21	283	21644	Y
miR535a-5p	TGACAACGAGAGAGACACGC	GTGCTCCTTCTGTTGTCAAC	chr06:30736366-30736528	21	163	305968	Y
miR535a-5p	TGACAACGAGAGAGACACGC	GTGCTCCTTCTCGTTGTCACA	chr08:40640859-40640962	21	104	305830	Y

miR535a-5p	TGACAACGAGAGAGAGCACGC	GTGCTCTTTCTCGTCGTCACC	chr09:40304598-40304795	21	198	325673	Y
miR535a-5p	TGACAACGAGAGAGAGCACGC	GTGCTTTCTATCGTTGTCAAT	chr10:35694300-35694402	21	103	313861	Y
miR535a-5p	TGACAACGAGAGAGAGCACGC	GTGCTCTTTCTCGTCGTCACC	chr06:5739325-5739429	21	105	325356	Y
miR535a-5p	TGACAACGAGAGAGAGCACGC	GTGCTCTTTCTCGTCGTCACC	chr08:259015-259119	21	105	326746	Y
miR535a-5p	TGACAACGAGAGAGAGCACGC	GTGCTCCTTCTCGTTGTCAAC	chr09:4414748-4414851	21	104	306194	Y
miR169-5p	TAGCCAAGGATGACTTGCCT		chr09:826990-827128	20	139	5	N15
miR169l	TAGCCAAGGATGACTTGCCT		chr05:22185924-22186038	20	115	3	N13
miR169l-5p	TAGCCAAGGATGACTTGCCTG		chr08:899135-899242	21	108	9	N15
miR169l-5p	TAGCCAAGGATGACTTGCCTG		chr06:1161846-1161951	21	106	10	N15
miR408b-5p	TGCACTGCCTCTTCCCTGGCT	TGCACTGCCTCTTCCCTGGCT	chr08:4102073-4102178	21	106	38718	N13
miR528-5p	TGGAAGGGGCATGCAGAGGAG	CCTGTGCCTGCCCTCCCACC	chr08:10814996-10815086	21	91	62968	Y
miR172-5p	AGAATCTTGATGATGCTGCAT	AGAATCTTGATGATGCTGCAT	chr11:24915318-24915519	21	202	34129	Y
miR172-5p	AGAATCTTGATGATGCTGCAT	AGAATCTTGATGATGCTGCAT	chr03:10763013-10763112	21	100	35631	Y
miR172a-5p	AGAATCTTGATGATGCTGCAT	AGAATCTTGATGATGCTGCAT	chr01:13474914-13475114	21	201	34558	Y
miR172a-5p	AGAATCTTGATGATGCTGCAT	AGAATCTTGATGATGCTGCAT	chr03:24275979-24276094	21	116	34195	Y
miR172a-5p	AGAATCTTGATGATGCTGCAT	AGAATCTTGATGATGCTGCAT	chr06:22769113-22769222	21	110	34195	Y
miR172a-5p	AGAATCTTGATGATGCTGCAT	AGAATCTTGATGATGCTGCAT	chr09:35731354-35731442	21	89	34105	Y
miR172a-5p	AGAATCTTGATGATGCTGCAT	AGAATCTTGATGATGCTGCAT	chr01:1264989-1265082	21	94	34135	Y
miR172a-5p	AGAATCTTGATGATGCTGCAT	AGAATCTTGATGATGCTGCAT	chr02:17211606-17211839	21	81	659210	Y
miR172a-5p	AGAATCTTGATGATGCTGCAT	AGAATCTTGATGATGCTGCAT	chr03:31545720-31545796	21	105	207087	Y
miR172a-5p	AGAATCTTGATGATGCTGCAT	AGAATCTTGATGATGCTGCAT	chr05:33766739-33766922	21	87	91463	Y
miR172a-5p	AGAATCTTGATGATGCTGCAT	AGAATCTTGATGATGCTGCAT	chr07:3410269-3410422	21	88	91466	Y
miR172a-5p	AGAATCTTGATGATGCTGCAT	AGAATCTTGATGATGCTGCAT	chr09:28956165-28956363	21	129	150355	Y
miR172c-5p	AGAATCTTGATGATGCTGCAC	AGAATCTTGATGATGCTGCAC	chr05:29333324-29333433	21	110	4606	Y
miR172e-3p	GGAATCTTGATGATGCTGCAT		chr04:33020443-33020530	21	88	154	N15
miR160	TGCCTGGCTCCTTGTATGCC		chr01:14625791-14626020	20	230	137	N15
miR160b-5p	TGCCTGGCTCCCTGTATGCCA	GCGTGCAAGGAGCCAAGCATG	chr02:14689973-14690093	21	121	1779	Y
miR160b-5p	TGCCTGGCTCCCTGTATGCCA	GCGTGCAAGGAGCCAAGCATG	chr03:28876582-28876714	21	133	2025	Y

miR160b-5p	TGCCTGGCTCCCTGTATGCCA	GCGTGCAAGGAGCCAAGCATG	chr05:39812041-39812223	21	183	2014	Y
miR160b-5p	TGCCTGGCTCCCTGTATGCCA		chr07:5927466-5927575	21	110	1976	N15
miR160b-5p	TGCCTGGCTCCCTGTATGCCA	GCGTGCAAGGAGCCAAGCATG	chr08:4724289-4724393	21	105	2016	Y
miR160b-5p	TGCCTGGCTCCCTGTACGCCA	GCGTGCAAGGAGCCAAGCACG	chr05:279700-279806	21	107	768	Y
miR160e-5p	TGCCTGGCTCCCTGAATGCCA		chr01:127222-127329	21	108	39	N15
miR160h-3p	CCTGGCTCCCTGTATGCCACA	CCTGGCTCCCTGTATGCCACA	chr06:15246561-15246691	21	131	19	N15
miR160h	TGCCTGGCTCCCTGCATGCCA		chr02:25384759-25384884	21	126	184	N15
miR164b-5p	TGGAGAAGCAGGGCACGTGCA	CACGTGCTCTTCTTCTCCAAC	chr02:2062397-2062491	21	95	10531	Y
miR164b-5p	TGGAGAAGCAGGGCACGTGCA	TCATGTGCTCATCTTCTCCACC	chr03:7221815-7222013	21	199	11047	N11
miR164b-5p	TGGAGAAGCAGGGCACGTGCA	CATGTGCTCGTCTTCTCCACC	chr06:34594370-34594472	21	103	11176	Y
miR164b-5p	TGGAGAAGCAGGGCACGTGCA	CATGTGCCATCTTCTCCACC	chr09:2887416-2887526	21	111	10748	Y
miR164b-5p	TGGAGAAGCAGGGCACGTGCA	CATGTGCTCATCTTCTCCACC	chr06:920148-920244	21	97	11050	Y
miR164c-5p	TGGAGAAGCAGGGCACGTGT		chr09:9352244-9352333	20	90	1939	N15
miR167a-5p	TGAAGCTGCCAGCATGATCTGA	AGATCATGTGGCCGCTTCATC	chr01:5517875-5517966	22	92	659783	Y
miR167a-5p	TGAAGCTGCCAGCATGATCTGA	AGATCATGTTGCAGCTTCATC	chr02:22555760-22555920	22	161	656441	Y
miR167a-5p	TGAAGCTGCCAGCATGATCT		chr02:22559226-22559343	21	118	18506	N15
miR167a-5p	TGAAGCTGCCAGCATGATCTGA	AGATCATCTGGCAGTTTCATC	chr03:34119077-34119186	22	110	665223	Y
miR167a-5p	TGAAGCTGCCAGCATGATCTA		chr04:33981570-33981688	21	119	18506	N15
miR167a-5p	TGAAGCTGCCAGCATGATCTGA		chr04:7565292-7565393	22	102	659380	N15
miR167a-5p	TGAAGCTGCCAGCATGATCT		chr05:2034500-2034607	20	108	18971	N15
miR167a-5p	TGAAGCTGCCAGCATGATCT		chr06:27089086-27089218	20	133	18506	N15
miR167a-5p	TCAAGCTGCCAGCATGATCTGA		chr07:1097509-1097617	22	109	335	N15
miR167a-5p	TGAAGCTGCCAGCATGATCTGA	AGATCATGTTGCAGTTTCATC	chr09:7003515-7003627	22	113	659207	N15
miR167a-5p	TGAAGCTGCCAGCATGATCTGA	AGATCATCTGGCAGTTTCATC	chr03:17273195-17273311	22	117	665364	Y
miR167a-5p	TGAAGCTGCCAGCATGATCTGA	AGGTCATCTGGCAGTTTCATC	chr03:30258088-30258197	22	110	660715	Y
miR167a-5p	TGAAGCTGCCAGCATGATCTGA	AGATCATGTTGCAGCTCCATC	chr04:33984969-33985049	22	79	775	Y
miR167b-5p	TAAAGCTGCCAGCATGATCTGA	AGATCATCTGGCAGTTTCATC	chr04:26473679-26473821	22	143	65943	Y
miR156a	TGACAGAAGAGAGAGAC		chr07:31787075-31787250	20	176	39	N15

miR156e-5p	TTGACAGAAGAGAGCGAGCAC		chr06:4163266-4163419	21	154	5530	N15
miR156e-5p	TTGACAGAAGAGAGCGAGCAC	GCTCACTTCTCTTCCTGTCAACC	chr09:26030484-26030689	21	125	6574	Y
miR157b-5p	TTGACAGAAGATAGAGAGCAC	GCTCTCTATGCTTCTGTCATCA	chr01:11906687-11906832	21	146	9008	Y
miR157b-5p	TTGACAGAAGATAGAGAGCAC	GCTCTCTGTTCTTCTGGCATCA	chr03:32974932-32975029	21	98	7843	Y
miR157b-5p	TTGACAGAAGATAGAGAGCAC	GCTCTCTATGCTTCTGTCATCA	chr09:34202112-34202236	21	125	9007	Y
miR529b-5p	AGAAGAGAGAGAGTACAGCTT	GCTGTACCCTCTCTCTTCTTC	chr06:18041891-18041994	21	104	87	Y
miR529b-5p	AGAAGAGAGAGAGTACAGCTT	GCTGTACCCTCTCTCTTCTTC	chr08:17886965-17887069	21	105	87	Y
miR156b-5p	TGACAGAAGAGAGTGAGCAC	GCTCACTGCTCTCTCTGTCATC	chr04:6310506-6310591	20	86	46664	Y
miR156b-5p	TGACAGAAGAGAGTGAGCAC	GCTCATTTCTCTTTCTGTCAGC	chr05:38171143-38171227	20	85	53222	Y
miR156b-5p	TGACAGAAGAGAGTGAGCAC		chr07:13075607-13075689	20	83	53305	N15
miR156b-5p	TGACAGAAGAGAGTGAGCAC	GCTCATTTCTCTTTCTGTCAGC	chr10:32671029-32671113	20	85	53222	Y
miR156b-5p	TGACAGGAGAGAGTGAGCAC		chr04:28347364-28347472	20	109	4182	N15
miR156b-5p	TGACAGGAGAGAGTGAGCAC	GCTCACTTCTCTTCCTGTCAGC	chr09:34802071-34802195	20	112	56741	Y
miR156e-5p	TTGACAGAAGAGAGTGAGCAC	GCTCACTGCTCTTCCTGTCAGCC	chr01:539633-539823	21	191	150403	Y
miR156e-5p	TTGACAGAAGAGAGTGAGCAC	CGTGCTCACTTCTCTTCCTGTCA	chr01:6594027-6594130	21	104	148312	N15
miR156e-5p	TTGACAGAAGAGAGTGAGCAC	TGCTCGCTCCTCTATCTGTCAGC	chr02:24384423-24384545	21	123	140396	Y
miR156e-5p	TTGACAGAAGAGAGTGAGCAC	GCTCACGTCTCTTCCTGTCAACC	chr02:25055317-25055429	21	113	140258	Y
miR156e-5p	TTGACAGAAGAGAGTGAGCACG	TGCTTACTTCTCTTCCTGTCAGTC	chr03:688774-688881	22	108	137989	N15
miR156e-5p	TTGACAGAAGAGAGTGAGCAC		chr04:28322446-28322555	21	110	140386	N15
miR156e-5p	TTGACAGAAGAGAGTGAGCAC	GCTCACTCCTCATCCTGTCAGCC	chr04:9661485-9661775	21	291	146514	Y
miR156e-5p	TTGACAGAAGAGAGTGAGCAC	GCTCACTTCTCTTCCTGTCAGCC	chr07:3883172-3883276	21	105	148154	Y
miR156e-5p	TTGACAGAAGAGAGTGAGCAC		chr08:2102934-2103048	21	115	137974	N15
miR156e-5p	TTGACAGAAGAGAGTGAGCAC	GCTCACCTCTCTCTGTCATCC	chr09:8711968-8712151	21	184	146987	Y
miR156e-5p	TTGACAGAAGAGAGTGAGCAC	GCTCACTTCTCTATCTGTCATCC	chr10:1508735-1508846	21	112	140390	N15
miR156e-5p	TTGACAGAAGAGAGTGAGCAC	GCTCACTCCTCTCTGTCATCC	chr10:6504494-6504603	21	110	146530	Y
miR156e-5p	TTGACAGAAGAGAGTGAGCAC	GCTCACGTCTCTTCCTGTCAACC	chr02:17873905-17874008	21	104	146501	Y
miR156e-5p	TTGACAGAAGAGAGTGAGCAC	GCTCACTTCTCTCTGTCAACT	chr02:24387606-24387777	21	172	139318	Y
miR156e-5p	TTGACAGAAGAGAGTGAGCAC	GCTCACTCCTCATCCTGTCAGCC	chr04:1697052-1697155	21	104	146580	Y

miR156e-5p	TTGACAGAAGAGAGTGAGCAC	GCTCACTACTCTCTGTGCATCT	chr05:3211944-3212072	21	89	3898	Y
miR171-5p	TGATTGAGCCGTGCCAATATC	TGATTGAGCCGTGCCAATATC	chr03:33962047-33962141	21	95	2069	Y
miR171-5p	TGATTGAGCCGTGCCAATATC	TGATTGAGCCGTGCCAATATC	chr04:7592204-7592289	21	86	2068	Y
miR171-5p	TGATTGAGCCGTGCCAATATC	TGATTGAGCCGTGCCAATATC	chr05:33030774-33030880	21	107	2058	Y
miR171-5p	TGATTGAGCCGTGCCAATATC	TGATTGAGCCGTGCCAATATC	chr11:830904-831011	21	108	2054	Y
miR171-5p	CGATTGAGCCGTGCCAATATC	CGATTGAGCCGTGCCAATATC	chr08:3295783-3295874	21	92	168	Y
miR171a-5p	TGATTGAGCCGCGCCAATATC	TGATTGAGCCGCGCCAATATC	chr05:8176694-8176803	21	110	11133	Y
miR171a-5p	TGATTGAGCCGCGCCAATATC	TGATTGAGCCGCGCCAATATC	chr04:24458993-24459095	21	154	34266	Y
miR171a-5p	TGATTGAGCCGCGCCAATATC	TGATTGAGCCGCGCCAATATC	chr04:32343733-32343828	21	206	6461	Y
miR171c-3p	AGATTGAGCCGCGCCAATATC	AGATTGAGCCGCGCCAATATC	chr01:8306745-8306826	21	82	25	N15
miR171e-5p	TTGAGCCGCGTCAATATCTCT	TTGAGCCGCGTCAATATCTCT	chr02:23357801-23358024	21	224	90505	Y
miR171e-5p	TTGAGCCGCGTCAATATCTCT	TTGAGCCGCGTCAATATCTCT	chr09:7589441-7589540	21	100	111151	Y
miR171e-5p	TTGAGCCGCGTCAATATCTCT	TTGAGCCGCGTCAATATCTCT	chr04:33571917-33572003	21	85	734	Y
miR171e-5p	TTGAGCCGCGTCAATATCTCT	TTGAGCCGCGTCAATATCTCT	chr04:36898947-36899034	21	77	34108	Y
miR171f-5p	TTGAGCCGCGCCAATATCACT	TTGAGCCGCGCCAATATCACT	chr01:285088-285169	21	82	10	Y
miR171f-5p	TTGAGCCGCGCCAATATCTCT	TTGAGCCGCGCCAATATCTCT	chr04:28138309-28138411	21	103	331	Y
miR319c-5p	TTGGACTGAAGGGAGCTCCT		chr07:6212243-6212342	20	100	638	N15
miR169-5p	TTTGGCTCTCTTCTTCTCATG	TTTGGCTCTCTTCTTCTCATG	chr01:14078948-14079076	22	129	70	Y
miR168b-5p	CCCGCCTTGACCAACTGAAT	CCCGCCTTGACCAACTGAAT	chr07:16150312-16150403	21	92	15900	Y
miR396a-5p	TTCCACAGCTTTCTTGAACG	TTCAATAAAGCTGTGGGAAA	chr01:407106-407196	20	91	1595	Y
miR396a-5p	TTCCACGCTTTCTTGAAGCTG	GTTCAAGAAAGATGTGGGAAA	chr01:7960407-7960531	21	125	11609	Y
miR396a-5p	TTCCACAGCTTTCTTGAAGCTG	GTTCAATAAAGCTGTGGGAAA	chr03:9906850-9907135	21	286	132222	Y
miR396a-5p	TTCCACAGCTTTCTTGAAGCTG	GTTCAACAAAGCTGTGGGAAA	chr04:28244798-28244895	21	98	131975	Y
miR396a-5p	TTCCACAGCTTTCTTGAAGCTG	GTTCAATAAAGCTGTGGGAAA	chr06:36208056-36208143	21	88	132131	Y
miR396a-5p	TTCCACAGCTTTCTTGAACG	TTCAATAAAGCTGTGGGAAA	chr07:23720220-23720490	20	271	1603	Y
miR396a-5p	TTCCACAGCTTTCTTGAAGCTG	GTTCAAGAAATCTGTGGGAAT	chr09:38531243-38531335	21	93	142030	Y
miR396a-5p	TTCCACAGCTTTCTTGAAGCTG	GTTCAATAAAGCTGTGGGAGA	chr01:16470117-16470216	21	100	132312	Y
miR396a-5p	TTCCACAGCTTTCTTGAAGCTG	TTCAGGAAAGCTGTGGGAAT	chr04:28239420-28239506	21	87	58154	Y

miR396a-5p	TTCCACAGCTTTCTTGAAGCTG	GTTCAATAAAGCTGTGGGAAG	chr06:3459867-3459963	21	97	131830	Y
miR396a-5p	TTCCACAGCTTTCTTGAAGCTG	GTTCAAGAAAGCTGTGGGAAT	chr06:36202082-36202196	21	115	134160	Y
miR396b-5p	TTCCACAGCTTTCTTGAAGCT	CTCAAGAAAGCTGTGGGAAA	chr10:18905329-18905407	20	79	55163	Y
miR396b-5p	TTCCACAGCTTTCTTGAAGCT	GTCAAGAAAGCTGTGGGAAGG	chr06:36205871-36205982	20	199	34173	Y
miR396b-5p	TTCCACAGCTTTCTTGAAGCT	GTCAAGAAAGCTGTGGGAAG	chr09:5874092-5874202	21	111	56739	Y
miR164b-5p	TGGAGAAGCAGGTCACGTGCA	CACGTGATCCTCTTCTCCAAC	chr11:25862710-25862802	21	93	1925	Y
miR164b-5p	TGGAGAAGCAGGTCACGTGCA	CACGTGCTCCTCTTCTCCAAC	chr11:4912164-4912261	21	98	1580	Y
miR171-5p	AGATGTTGGCCCGTTCAATT	TTGAGCCGTGCCAATATCACG	chr05:39740610-39740718	21	109	710	Y
miR171-5p	AGATGTTGGCCCGTTCAATT	TTGAGCCGTGCCAATATCACG	chr05:39740622-39740727	21	106	710	Y
miR164c-5p	TGGAGAAGCAGGGTACGTGCA	CATGTGCCATCTTCTCCATC	chr05:10389500-10389614	21	115	6552	Y
miR164c-5p	TGGAGAAGCAGGGTACGTGCA	CATGTGCCATCTTCTCCATC	chr10:4747372-4747479	21	108	6564	Y
miR396a-5p	TCCACAGCTTTCTTGAAGCTG		chr03:14715639-14715821	21	183	251491	N15
miR396a-5p	TCCACAGCTTTCTTGAAGCTG	GTTCAAGAAAGTCCCTGGAGA	chr01:1573387-1573501	21	115	251330	Y
miR396a-5p	TCCACAGCTTTCTTGAAGCTG	GTTCAAGAAAGCCCGTGGAAA	chr01:7957883-7958058	21	176	203134	Y
miR393a-5p	TCCAAAGGGATCGCATTGATC	TCATGCGATCTTTTTGGATA	chr03:24194512-24194596	21	234	34523	Y
miR398a-5p	TGTGTTCTCAGGTCGCCCCTG	TGTGTTCTCAGGTCGCCCCTG	chr11:21353880-21353998	21	119	25392	Y
miR827-5p	TTAGATGACCATCAGCAAACA	TTAGATGACCATCAGCAAACA	chr10:28130905-28131200	22	296	30591	Y
miR1432-5p	TCCAGGAGAGATGACACCAAC	CGGTGTCATCCCTACTGGACG	chr04:29804256-29804373	21	118	6926	Y
miR168b-5p	TCGCTTGGTGCAGGTCGGGAA	CCCCACTTGCATCAAGTGAAT	chr01:10328455-10328716	21	262	60913	Y
miR168b-5p	TCGCTTGGTGCAGGTCGGGAA	CCCGCCTTGCACCAACTGAAT	chr01:13933987-13934079	21	93	83942	Y
miR168b-5p	TCGCTTGGTGCAGGTCGGGAA	CCCCTCTTGCATCAAGTGAAT	chr01:18741206-18741466	21	261	65521	Y
miR168b-5p	TCGCTTGGTGCAGGTCGGGAA	CCCGCCTTGCACCAACTGAAT	chr03:10679639-10679721	21	83	82478	Y
miR168b-5p	TCGCTTGGTGCAGGTCGGGAA	CCCGCCTTGCACCAACTGAAT	chr03:31836201-31836386	21	186	77291	Y
miR168b-5p	TCGCTTGGTGCAGGTCGGGAA	ACCGCCTTGCACCAACTGAAT	chr04:4290459-4290550	21	92	69399	Y
miR168b-5p	TCGCTTGGTGCAGGTCGGGAA	CCCGCCTTGCACCAACTGAAT	chr04:9373491-9373585	21	95	83092	Y
miR168b-5p	TCGCTTGGTGCAGGTCGGGAA	CCCGCCTTGCACCAACTGAAT	chr09:35428915-35429023	21	109	84586	Y
miR393b-5p	TTCCAAAGGGATCGCATTGATC		chr02:17070694-17070797	22	104	12973	N15
miR393b-5p	TTCCAAAGGGATCGCATTGATC	TCATGCGATTCTTCTGGAATT	chr04:8535028-8535117	22	90	13133	Y

miR393b-5p	TCCAAAGGGATCGCATTGATC		chr05:41296286-41296405	22	120	637	N15
miR393b-5p	TTCCAAAGGGATCGCATTGATC	TCATGCGATTCCCTTAGGAATT	chr09:29541296-29541569	22	274	12982	Y
miR393b-5p	TTCCAAAGGGATCGCATTGATC	TCATGCGATTCCCTTTGGAATT	chr04:3352232-3352322	22	91	13764	Y
miR529-5p	GCTGTACCCTCTCTCTTCTTC	GCTGTACCCTCTCTCTTCTTC	chr02:18489294-18489388	21	95	28	Y
miR529-5p	GCTGTACCCTCTCTCTTCTTC	GCTGTACCCTCTCTCTTCTTC	chr06:30947642-30947730	21	89	28	Y
miR157b-5p	TTGACAGAAGATAGAGAGCAC	GCTCTCTATGCTTCTGTATCA	chrUn_random:35600581-35600684	21	104	9006	Y
miR169g	TGGCAAGTTGTCTTTGGCTACA		chr05:40655880-40655988	22	109	95	N15
miR171b-3p	CGAGCCGAACCAATATCACTC	CGAGCCGAACCAATATCACTC	chr09:33074374-33074465	21	92	38	N15
miR171l-5p	TTGGCGTGCCTCAATCTGAAG	TTGGATTGAGCCGCGTCAATA	chr08:33266823-33266926	21	104	35462	Y
miR391-5p	CCGAGGAGAGATGATGCCGCT	CGGTATCATCTACTGCGCAG	chr05:6014360-6014471	22	112	14545	Y
miR482b-5p	TTTCCAATACCTCCCATGCCAA	TTTCCAATACCTCCCATGCCAA	chr09:34223218-34223319	23	102	57130	Y

**Tabela suplementar 4. Continuação**

miRNA	TargetFinder Score	<i>M. acuminata</i> protein ID	Target	PFAM/IPR ID
miR390a-5p	3	Ma01_g11010	DNA-binding protein RHL1	IPR038859 (DNA-binding protein RHL1)
miR2118-5p	3,5	Ma05_g11770	disease resistance protein RPS2	PF00931 (NB-ARC domain)
miR319-5p	3,5	Ma02_g09210	Putative Ethylene-responsive transcription factor 1	PF00005 (ABC transporter)/PF00664 (ABC transporter transmembrane region)
miR166a-3p	3	Ma04_g38190	homeobox-leucine zipper protein HOX32	PF00046 (Homeodomain)/PF01852 (START domain)/PF08670 (MEKHLA domain)
miR166a-5p	3	Ma04_g38190	homeobox-leucine zipper protein HOX32	PF00046 (Homeodomain)/PF01852 (START domain)/PF08670 (MEKHLA domain)
miR166a-5p	3	Ma04_g38190	homeobox-leucine zipper protein HOX32	PF00046 (Homeodomain)/PF01852 (START domain)/PF08670 (MEKHLA domain)
miR166c-5p	3	Ma04_g38190	homeobox-leucine zipper protein HOX32	PF00046 (Homeodomain)/PF01852 (START domain)/PF08670 (MEKHLA domain)
miR166c-5p	3	Ma04_g38190	homeobox-leucine zipper protein HOX32	PF00046 (Homeodomain)/PF01852 (START domain)/PF08670 (MEKHLA domain)
miR166c-5p	3	Ma04_g38190	homeobox-leucine zipper protein HOX32	PF00046 (Homeodomain)/PF01852 (START domain)/PF08670 (MEKHLA domain)
miR166c-5p	3	Ma04_g38190	homeobox-leucine zipper protein HOX32	PF00046 (Homeodomain)/PF01852 (START domain)/PF08670 (MEKHLA domain)
miR166c-5p	3	Ma04_g38190	homeobox-leucine zipper protein HOX32	PF00046 (Homeodomain)/PF01852 (START domain)/PF08670 (MEKHLA domain)
miR166c-5p	3	Ma04_g38190	homeobox-leucine zipper protein HOX32	PF00046 (Homeodomain)/PF01852 (START domain)/PF08670 (MEKHLA domain)

miR166c-5p	3	Ma07_g28220	homeobox-leucine zipper protein HOX32	PF00046 (Homeodomain)/PF01852 (START domain)/PF08670 (MEKHLA domain)
miR166c-5p	3	Ma04_g38190	homeobox-leucine zipper protein HOX32	PF00046 (Homeodomain)/PF01852 (START domain)/PF08670 (MEKHLA domain)
miR166c-5p	3	Ma04_g38190	homeobox-leucine zipper protein HOX32	PF00046 (Homeodomain)/PF01852 (START domain)/PF08670 (MEKHLA domain)
miR166c-5p	3	Ma04_g38190	homeobox-leucine zipper protein HOX32	PF00046 (Homeodomain)/PF01852 (START domain)/PF08670 (MEKHLA domain)
miR166c-5p	3	Ma04_g38190	homeobox-leucine zipper protein HOX32	PF00046 (Homeodomain)/PF01852 (START domain)/PF08670 (MEKHLA domain)
miR166c-5p	3	Ma04_g38190	homeobox-leucine zipper protein HOX32	PF00046 (Homeodomain)/PF01852 (START domain)/PF08670 (MEKHLA domain)
miR166c-5p	3	Ma04_g38190	homeobox-leucine zipper protein HOX32	PF00046 (Homeodomain)/PF01852 (START domain)/PF08670 (MEKHLA domain)
miR166c-5p	3	Ma04_g38190	homeobox-leucine zipper protein HOX32	PF00046 (Homeodomain)/PF01852 (START domain)/PF08670 (MEKHLA domain)
miR166c-5p	3	Ma04_g38190	homeobox-leucine zipper protein HOX32	PF00046 (Homeodomain)/PF01852 (START domain)/PF08670 (MEKHLA domain)
miR166c-5p	3	Ma04_g38190	homeobox-leucine zipper protein HOX32	PF00046 (Homeodomain)/PF01852 (START domain)/PF08670 (MEKHLA domain)
miR166e-3p	1	Ma04_g38190	homeobox-leucine zipper protein HOX32	PF00046 (Homeodomain)/PF01852 (START domain)/PF08670 (MEKHLA domain)
miR390a-5p	3	Ma04_g39340	LRR receptor-like serine/threonine-protein	PF00069 (Protein kinase domain)/PF00560 (Leucine Rich Repeat)/PF08263
miR390a-5p	3	Ma04_g39340	LRR receptor-like serine/threonine-protein	PF00069 (Protein kinase domain)/PF00560 (Leucine Rich Repeat)/PF08263
miR390a-5p	3	Ma04_g39340	LRR receptor-like serine/threonine-protein	PF00069 (Protein kinase domain)/PF00560 (Leucine Rich Repeat)/PF08263
miR390a-5p	3	Ma04_g39340	LRR receptor-like serine/threonine-protein	PF00069 (Protein kinase domain)/PF00560 (Leucine Rich Repeat)/PF08263
miR162a-5p	0	Ma04_g10380	UDP-glycosyltransferase 88A1-like	PF00201 (UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase)
miR162a-5p	1	Ma04_g10380	UDP-glycosyltransferase 88A1-like	PF00201 (UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase)
miR162a-5p	0	Ma04_g10380	UDP-glycosyltransferase 88A1-like	PF00201 (UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase)
miR162a-5p	0	Ma04_g10380	UDP-glycosyltransferase 88A1-like	PF00201 (UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase)
miR162a-5p	0	Ma04_g10380	UDP-glycosyltransferase 88A1-like	PF00201 (UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase)
miR162a-5p	0	Ma04_g10380	UDP-glycosyltransferase 88A1-like	PF00201 (UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase)
miR319d-5p	4	Ma10_g14610	hydroquinone glucosyltransferase	PF00201 (UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase)
miR159a-5p	3,5	Ma01_g10440	transcription factor GAMYB-like, transcript variant X2	PF00249 (Myb-like DNA-binding domain)/PF13921 (Myb-like DNA-binding domain)
miR159a-5p	3,5	Ma01_g10440	transcription factor GAMYB-like, transcript variant X2	PF00249 (Myb-like DNA-binding domain)/PF13921 (Myb-like DNA-binding domain)
miR159b-5p	3	Ma01_g10440	transcription factor GAMYB-like, transcript variant X2	PF00249 (Myb-like DNA-binding domain)/PF13921 (Myb-like DNA-binding domain)
miR159b-5p	3	Ma01_g10440	transcription factor GAMYB-like, transcript variant X2	PF00249 (Myb-like DNA-binding domain)/PF13921 (Myb-like DNA-binding domain)

miR159c-3p	4	Ma01_g10440	transcription factor GAMYB-like, transcript variant X2	PF00249 (Myb-like DNA-binding domain)/PF13921 (Myb-like DNA-binding domain)
miR159c-3p	4	Ma01_g10440	transcription factor GAMYB-like, transcript variant X2	PF00249 (Myb-like DNA-binding domain)/PF13921 (Myb-like DNA-binding domain)
miR159c-3p	4	Ma01_g10440	transcription factor GAMYB-like, transcript variant X2	PF00249 (Myb-like DNA-binding domain)/PF13921 (Myb-like DNA-binding domain)
miR535d-5p	3	Ma08_g07960	30S ribosomal protein S17	PF00366 (ribosomal protein S17)
miR530a-5p	4	Ma10_g14410	60S ribosomal protein L26-2-like	PF00467 (KOW motif)/PF16906 (Ribosomal proteins L26 eukaryotic, L24P archaeal)
miR395a-3p	1	Ma01_g05840	sulfate transporter 2.1	PF00916 (Sulfate permease family)/PF01740 (STAS domain)
miR395a-5p	1	Ma01_g05840	sulfate transporter 2.1	PF00916 (Sulfate permease family)/PF01740 (STAS domain)
miR395a-5p	1	Ma01_g05840	sulfate transporter 2.1	PF00916 (Sulfate permease family)/PF01740 (STAS domain)
miR399b-3p	4	Ma08_g07240	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase	PF01453 (D-mannose binding lectin)/PF07714 (Protein tyrosine and serine/threonine kinase)
miR391-5p	3,5	Ma01_g00140	pentatricopeptide repeat-containing protein At3g02490,	PF01535 (PPR repeat)
miR397a-5p	4	Ma03_g12850	pentatricopeptide repeat-containing protein At3g16610-like	PF01535 (PPR repeat)/PF12854 (PPR repeat)/PF13041 (PPR repeat family)
miR535a-5p	3	Ma09_g23570	squamosa promoter-binding-like protein 12	PF03110 (SBP domain)
miR535a-5p	3	Ma09_g23570	squamosa promoter-binding-like protein 12	PF03110 (SBP domain)
miR535a-5p	3	Ma09_g23570	squamosa promoter-binding-like protein 12	PF03110 (SBP domain)
miR535a-5p	3	Ma09_g23570	squamosa promoter-binding-like protein 12	PF03110 (SBP domain)
miR535a-5p	3	Ma09_g23570	squamosa promoter-binding-like protein 12	PF03110 (SBP domain)
miR535a-5p	3	Ma09_g23570	squamosa promoter-binding-like protein 12	PF03110 (SBP domain)
miR535a-5p	3	Ma09_g23570	squamosa promoter-binding-like protein 12	PF03110 (SBP domain)
miR535a-5p	3	Ma09_g23570	squamosa promoter-binding-like protein 12	PF03110 (SBP domain)
miR169-5p	3	Ma04_g11070	nuclear transcription factor Y subunit A-8-like	PF02045 (CCAAT-binding transcription factor (CBF-B/NF-YA) subunit B)
miR169l	3	Ma04_g11070	nuclear transcription factor Y subunit A-8-like	PF02045 (CCAAT-binding transcription factor (CBF-B/NF-YA) subunit B)
miR169l-5p	3	Ma04_g11070	nuclear transcription factor Y subunit A-8-like	PF02045 (CCAAT-binding transcription factor (CBF-B/NF-YA) subunit B)

miR169l-5p	3	Ma04_g11070	nuclear transcription factor Y subunit A-8-like	PF02045 (CCAAT-binding transcription factor (CBF-B/NF-YA) subunit B)
miR408b-5p	3,5	Ma11_g05520	putative serine/threonine-protein kinase	PF07714 (Protein tyrosine and serine/threonine kinase) PF12142 (Polyphenol oxidase middle domain), PF00264 (Common central domain of tyrosinase)
miR528-5p	2	Ma08_g34740	polyphenol oxidase chloroplastic-like	
miR172-5p	0	Ma04_g06130	floral homeotic protein APETALA 2-like	PF00847 (AP2 domain)
miR172-5p	0	Ma04_g06130	floral homeotic protein APETALA 2-like	PF00847 (AP2 domain)
miR172a-5p	0	Ma04_g06130	floral homeotic protein APETALA 2-like	PF00847 (AP2 domain)
miR172a-5p	0	Ma04_g06130	floral homeotic protein APETALA 2-like	PF00847 (AP2 domain)
miR172a-5p	0	Ma04_g06130	floral homeotic protein APETALA 2-like	PF00847 (AP2 domain)
miR172a-5p	0	Ma04_g06130	floral homeotic protein APETALA 2-like	PF00847 (AP2 domain)
miR172a-5p	0	Ma04_g06130	floral homeotic protein APETALA 2-like	PF00847 (AP2 domain)
miR172a-5p	0	Ma04_g06130	floral homeotic protein APETALA 2-like	PF00847 (AP2 domain)
miR172a-5p	0	Ma04_g06130	floral homeotic protein APETALA 2-like	PF00847 (AP2 domain)
miR172a-5p	0	Ma04_g06130	floral homeotic protein APETALA 2-like	PF00847 (AP2 domain)
miR172a-5p	0	Ma04_g06130	floral homeotic protein APETALA 2-like	PF00847 (AP2 domain)
miR172a-5p	0	Ma04_g06130	floral homeotic protein APETALA 2-like	PF00847 (AP2 domain)
miR172a-5p	0	Ma04_g06130	floral homeotic protein APETALA 2-like	PF00847 (AP2 domain)
miR172c-5p	1	Ma04_g06130	floral homeotic protein APETALA 2-like	PF00847 (AP2 domain)
miR172e-3p	0,5	Ma04_g06130	floral homeotic protein APETALA 2-like	PF00847 (AP2 domain)
miR160	1	Ma05_g14540	auxin response factor 18-like	PF02362 (B3 DNA binding domain)/PF06507 (Auxin response factor)
miR160b-5p	1	Ma05_g14540	auxin response factor 18-like	PF02362 (B3 DNA binding domain)/PF06507 (Auxin response factor)
miR160b-5p	1	Ma05_g14540	auxin response factor 18-like	PF02362 (B3 DNA binding domain)/PF06507 (Auxin response factor)
miR160b-5p	1	Ma05_g14540	auxin response factor 18-like	PF02362 (B3 DNA binding domain)/PF06507 (Auxin response factor)
miR160b-5p	1	Ma05_g14540	auxin response factor 18-like	PF02362 (B3 DNA binding domain)/PF06507 (Auxin response factor)
miR160b-5p	1	Ma05_g14540	auxin response factor 18-like	PF02362 (B3 DNA binding domain)/PF06507 (Auxin response factor)
miR160b-5p	1	Ma05_g14540	auxin response factor 18-like	PF02362 (B3 DNA binding domain)/PF06507 (Auxin response factor)
miR160b-5p	2	Ma05_g14540	auxin response factor 18-like	PF02362 (B3 DNA binding domain)/PF06507 (Auxin response factor)
miR160e-5p	2	Ma05_g14540	auxin response factor 18-like	PF02362 (B3 DNA binding domain)/PF06507 (Auxin response factor)
miR160h-3p	3	Ma05_g14540	auxin response factor 18-like	PF02362 (B3 DNA binding domain)/PF06507 (Auxin response factor)
miR160h	1	Ma05_g03730	Putative Auxin response factor 18	PF02362 (B3 DNA binding domain)/PF06507 (Auxin response factor)

miR164b-5p	3,5	Ma11_g24070	probable alpha-glucosidase	PF01055 (Glycosyl hydrolases family 31), PF13802 (Galactose mutarotase-like)
miR164b-5p	3,5	Ma11_g24070	probable alpha-glucosidase	PF01055 (Glycosyl hydrolases family 31), PF13802 (Galactose mutarotase-like)
miR164b-5p	3,5	Ma11_g24070	probable alpha-glucosidase	PF01055 (Glycosyl hydrolases family 31), PF13802 (Galactose mutarotase-like)
miR164b-5p	3,5	Ma11_g24070	probable alpha-glucosidase	PF01055 (Glycosyl hydrolases family 31), PF13802 (Galactose mutarotase-like)
miR164b-5p	3,5	Ma11_g24070	probable alpha-glucosidase	PF01055 (Glycosyl hydrolases family 31), PF13802 (Galactose mutarotase-like)
miR164c-5p	3	Ma11_g24070	probable alpha-glucosidase	PF01055 (Glycosyl hydrolases family 31), PF13802 (Galactose mutarotase-like)
miR167a-5p	0	Ma11_g01530	auxin response factor 12-like	PF06507 (Auxin response factor), PF02309 (AUX/IAA family), PF02362 (B3 DNA binding domain)
miR167a-5p	0	Ma11_g01530	auxin response factor 12-like	PF06507 (Auxin response factor), PF02309 (AUX/IAA family), PF02362 (B3 DNA binding domain)
miR167a-5p	0	Ma11_g01530	auxin response factor 12-like	PF06507 (Auxin response factor), PF02309 (AUX/IAA family), PF02362 (B3 DNA binding domain)
miR167a-5p	0	Ma11_g01530	auxin response factor 12-like	PF06507 (Auxin response factor), PF02309 (AUX/IAA family), PF02362 (B3 DNA binding domain)
miR167a-5p	0	Ma11_g01530	auxin response factor 12-like	PF06507 (Auxin response factor), PF02309 (AUX/IAA family), PF02362 (B3 DNA binding domain)
miR167a-5p	0	Ma11_g01530	auxin response factor 12-like	PF06507 (Auxin response factor), PF02309 (AUX/IAA family), PF02362 (B3 DNA binding domain)
miR167a-5p	0	Ma11_g01530	auxin response factor 12-like	PF06507 (Auxin response factor), PF02309 (AUX/IAA family), PF02362 (B3 DNA binding domain)
miR167a-5p	0	Ma11_g01530	auxin response factor 12-like	PF06507 (Auxin response factor), PF02309 (AUX/IAA family), PF02362 (B3 DNA binding domain)
miR167a-5p	0	Ma11_g01530	auxin response factor 12-like	PF06507 (Auxin response factor), PF02309 (AUX/IAA family), PF02362 (B3 DNA binding domain)
miR167a-5p	0	Ma11_g01530	auxin response factor 12-like	PF06507 (Auxin response factor), PF02309 (AUX/IAA family), PF02362 (B3 DNA binding domain)
miR167a-5p	0	Ma11_g01530	auxin response factor 12-like	PF06507 (Auxin response factor), PF02309 (AUX/IAA family), PF02362 (B3 DNA binding domain)
miR167a-5p	0	Ma11_g01530	auxin response factor 12-like	PF06507 (Auxin response factor), PF02309 (AUX/IAA family), PF02362 (B3 DNA binding domain)
miR167a-5p	0	Ma11_g01530	auxin response factor 12-like	PF06507 (Auxin response factor), PF02309 (AUX/IAA family), PF02362 (B3 DNA binding domain)
miR167a-5p	0	Ma11_g01530	auxin response factor 12-like	PF06507 (Auxin response factor), PF02309 (AUX/IAA family), PF02362 (B3 DNA binding domain)
miR167b-5p	2	Ma11_g01530	auxin response factor 12-like	PF06507 (Auxin response factor), PF02309 (AUX/IAA family), PF02362 (B3 DNA binding domain)
miR156a	0	Ma08_g24570	squamosa promoter-binding-like protein 12	PF03110 (SBP domain)
miR156e-5p	1	Ma08_g24570	squamosa promoter-binding-like protein 12	PF03110 (SBP domain)

---

miR156e-5p	1	Ma08_g24570	squamosa promoter-binding-like protein 12	PF03110 (SBP domain)
miR157b-5p	2	Ma08_g24570	squamosa promoter-binding-like protein 12	PF03110 (SBP domain)
miR157b-5p	2	Ma08_g24570	squamosa promoter-binding-like protein 12	PF03110 (SBP domain)
miR157b-5p	2	Ma08_g24570	squamosa promoter-binding-like protein 12	PF03110 (SBP domain)
miR529b-5p	1	Ma04_g01370	squamosa promoter-binding-like protein 14	PF03110 (SBP domain)
miR529b-5p	1	Ma04_g01370	squamosa promoter-binding-like protein 14	PF03110 (SBP domain)
miR156b-5p	0	Ma09_g28300	squamosa promoter-binding-like protein 14	PF03110 (SBP domain)
miR156b-5p	0	Ma09_g28300	squamosa promoter-binding-like protein 14	PF03110 (SBP domain)
miR156b-5p	0	Ma09_g28300	squamosa promoter-binding-like protein 14	PF03110 (SBP domain)
miR156b-5p	0	Ma09_g28300	squamosa promoter-binding-like protein 14	PF03110 (SBP domain)
miR156b-5p	1	Ma09_g28300	squamosa promoter-binding-like protein 14	PF03110 (SBP domain)
miR156b-5p	1	Ma09_g28300	squamosa promoter-binding-like protein 14	PF03110 (SBP domain)
miR156e-5p	0,5	Ma09_g28300	squamosa promoter-binding-like protein 14	PF03110 (SBP domain)
miR156e-5p	0,5	Ma09_g28300	squamosa promoter-binding-like protein 14	PF03110 (SBP domain)
miR156e-5p	0,5	Ma09_g28300	squamosa promoter-binding-like protein 14	PF03110 (SBP domain)
miR156e-5p	0,5	Ma09_g28300	squamosa promoter-binding-like protein 14	PF03110 (SBP domain)
miR156e-5p	0,5	Ma09_g28300	squamosa promoter-binding-like protein 14	PF03110 (SBP domain)
miR156e-5p	0,5	Ma09_g28300	squamosa promoter-binding-like protein 14	PF03110 (SBP domain)
miR156e-5p	0,5	Ma09_g28300	squamosa promoter-binding-like protein 14	PF03110 (SBP domain)
miR156e-5p	0,5	Ma09_g28300	squamosa promoter-binding-like protein 14	PF03110 (SBP domain)
miR156e-5p	0,5	Ma09_g28300	squamosa promoter-binding-like protein 14	PF03110 (SBP domain)

---

miR156e-5p	0,5	Ma09_g28300	squamosa promoter-binding-like protein 14	PF03110 (SBP domain)
miR156e-5p	0,5	Ma09_g28300	squamosa promoter-binding-like protein 14	PF03110 (SBP domain)
miR156e-5p	0,5	Ma09_g28300	squamosa promoter-binding-like protein 14	PF03110 (SBP domain)
miR156e-5p	0,5	Ma09_g28300	squamosa promoter-binding-like protein 14	PF03110 (SBP domain)
miR156e-5p	0,5	Ma09_g28300	squamosa promoter-binding-like protein 14	PF03110 (SBP domain)
miR156e-5p	0,5	Ma09_g28300	squamosa promoter-binding-like protein 14	PF03110 (SBP domain)
miR156e-5p	0,5	Ma09_g28300	squamosa promoter-binding-like protein 14	PF03110 (SBP domain)
miR156e-5p	0,5	Ma09_g28300	squamosa promoter-binding-like protein 14	PF03110 (SBP domain)
miR171-5p	1	Ma07_g06770	scarecrow-like protein 6	PF03514 (GRAS domain family)
miR171-5p	1	Ma07_g06770	scarecrow-like protein 6	PF03514 (GRAS domain family)
miR171-5p	1	Ma07_g06770	scarecrow-like protein 6	PF03514 (GRAS domain family)
miR171-5p	1	Ma05_g23270	scarecrow-like protein 6	PF03514 (GRAS domain family)
miR171-5p	2	Ma07_g06770	scarecrow-like protein 6	PF03514 (GRAS domain family)
miR171a-5p	0	Ma07_g06770	scarecrow-like protein 6	PF03514 (GRAS domain family)
miR171a-5p	0	Ma07_g06770	scarecrow-like protein 6	PF03514 (GRAS domain family)
miR171a-5p	0	Ma07_g06770	scarecrow-like protein 6	PF03514 (GRAS domain family)
miR171c-3p	1	Ma07_g06770	scarecrow-like protein 6	PF03514 (GRAS domain family)
miR171e-5p	2,5	Ma07_g06770	scarecrow-like protein 6	PF03514 (GRAS domain family)
miR171e-5p	2,5	Ma06_g38750	scarecrow-like protein 6	PF03514 (GRAS domain family)
miR171e-5p	2,5	Ma07_g06770	scarecrow-like protein 6	PF03514 (GRAS domain family)
miR171e-5p	2,5	Ma07_g06770	scarecrow-like protein 6	PF03514 (GRAS domain family)
miR171f-5p	2	Ma07_g06770	scarecrow-like protein 6	PF03514 (GRAS domain family)
miR171f-5p	1,5	Ma07_g06770	scarecrow-like protein 6	PF03514 (GRAS domain family)
miR319c-5p	2,5	Ma03_g32580	transcription factor TCP4-like	PF03634 (TCP family transcription factor)
miR169-5p	3,5	Ma05_g05130	RNA-binding protein 38-like	PF00076 (RNA recognition motif. (a.k.a. RRM, RBD, or RNP domain)

miR168b-5p	4	Ma06_g27460	U-box domain-containing protein 26-like	PF04564 (U-box domain)
miR396a-5p	1	Ma01_g15340	growth-regulating factor 1-like	PF08880 (QLQ), PF08879 (WRC)
miR396a-5p	2	Ma01_g15340	growth-regulating factor 1-like	PF08880 (QLQ), PF08879 (WRC)
miR396a-5p	1	Ma01_g15340	growth-regulating factor 1-like	PF08880 (QLQ), PF08879 (WRC)
miR396a-5p	1	Ma01_g15340	growth-regulating factor 1-like	PF08880 (QLQ), PF08879 (WRC)
miR396a-5p	1	Ma01_g15340	growth-regulating factor 1-like	PF08880 (QLQ), PF08879 (WRC)
miR396a-5p	1	Ma01_g15340	growth-regulating factor 1-like	PF08880 (QLQ), PF08879 (WRC)
miR396a-5p	1	Ma01_g15340	growth-regulating factor 1-like	PF08880 (QLQ), PF08879 (WRC)
miR396a-5p	1	Ma01_g15340	growth-regulating factor 1-like	PF08880 (QLQ), PF08879 (WRC)
miR396a-5p	1	Ma01_g15340	growth-regulating factor 1-like	PF08880 (QLQ), PF08879 (WRC)
miR396a-5p	1	Ma01_g15340	growth-regulating factor 1-like	PF08880 (QLQ), PF08879 (WRC)
miR396a-5p	1	Ma01_g15340	growth-regulating factor 1-like	PF08880 (QLQ), PF08879 (WRC)
miR396b-5p	0	Ma01_g15340	growth-regulating factor 1-like	PF08880 (QLQ), PF08879 (WRC)
miR396b-5p	0	Ma01_g15340	growth-regulating factor 1-like	PF08880 (QLQ), PF08879 (WRC)
miR396b-5p	0	Ma01_g15340	growth-regulating factor 1-like	PF08880 (QLQ), PF08879 (WRC)
miR164b-5p	3	Ma02_g21420	inositol-pentakisphosphate 2-kinase-like	PF06090 (Inositol-pentakisphosphate 2-kinase)
miR164b-5p	3	Ma02_g21420	inositol-pentakisphosphate 2-kinase-like	PF06090 (Inositol-pentakisphosphate 2-kinase)
miR171-5p	3,5	Ma11_g08370	proline transporter 2-like	PF01490 (Transmembrane amino acid transporter protein)
miR171-5p	3,5	Ma11_g08370	proline transporter 2-like	PF01490 (Transmembrane amino acid transporter protein)
miR164c-5p	3,5	Ma08_g25810	probable indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.5	PF03321 (GH3 auxin-responsive promoter)
miR164c-5p	3,5	Ma08_g25810	probable indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.5	PF03321 (GH3 auxin-responsive promoter)
miR396a-5p	1	Ma01_g15340	growth-regulating factor 1	PF08879 (WRC)/PF08880 (QLQ)
miR396a-5p	1	Ma01_g15340	growth-regulating factor 1	PF08879 (WRC)/PF08880 (QLQ)
miR396a-5p	1	Ma01_g15340	growth-regulating factor 1	PF08879 (WRC)/PF08880 (QLQ)
miR393a-5p	1	Ma05_g29320	transport inhibitor response 1-like protein	PF13516 (Leucine Rich repeat)
miR398a-5p	3,5	Ma07_g23780	F-box/LRR-repeat protein 3-like, transcript variant X1	PF13516 (Leucine Rich repeat)
miR827-5p	4	Ma04_g03420	zinc finger protein ZAT4	PF13912 (C2H2-type zinc finger)

miR1432-5p	4	Ma05_g06390	uncharacterized LOC103984114	PF04859 (Plant protein of unknown function (DUF641))
miR168b-5p	0,5	Ma00_g00420	protein argonaute 1B	PF02170 (PAZ domain), PF02171 (Piwi domain), PF08699 (Argonaute linker 1 domain)
miR168b-5p	0,5	Ma00_g00420	protein argonaute 1B	PF02170 (PAZ domain), PF02171 (Piwi domain), PF08699 (Argonaute linker 1 domain)
miR168b-5p	0,5	Ma00_g00420	protein argonaute 1B	PF02170 (PAZ domain), PF02171 (Piwi domain), PF08699 (Argonaute linker 1 domain)
miR168b-5p	0,5	Ma00_g00420	protein argonaute 1B	PF02170 (PAZ domain), PF02171 (Piwi domain), PF08699 (Argonaute linker 1 domain)
miR168b-5p	0,5	Ma00_g00420	protein argonaute 1B	PF02170 (PAZ domain), PF02171 (Piwi domain), PF08699 (Argonaute linker 1 domain)
miR168b-5p	0,5	Ma00_g00420	protein argonaute 1B	PF02170 (PAZ domain), PF02171 (Piwi domain), PF08699 (Argonaute linker 1 domain)
miR168b-5p	0,5	Ma00_g00420	protein argonaute 1B	PF02170 (PAZ domain), PF02171 (Piwi domain), PF08699 (Argonaute linker 1 domain)
miR168b-5p	0,5	Ma00_g00420	protein argonaute 1B	PF02170 (PAZ domain), PF02171 (Piwi domain), PF08699 (Argonaute linker 1 domain)
miR393b-5p	2	Ma06_g18000	transport inhibitor response 1-like protein	PF18791 (Transport inhibitor response 1 protein domain)/PF18511 (F-box)/PF13516 (Leucine Rich repeat)
miR393b-5p	2	Ma06_g18000	transport inhibitor response 1-like protein	PF18791 (Transport inhibitor response 1 protein domain)/PF18511 (F-box)/PF13516 (Leucine Rich repeat)
miR393b-5p	1	Ma06_g18000	transport inhibitor response 1-like protein	PF18791 (Transport inhibitor response 1 protein domain)/PF18511 (F-box)/PF13516 (Leucine Rich repeat)
miR393b-5p	2	Ma06_g18000	transport inhibitor response 1-like protein	PF18791 (Transport inhibitor response 1 protein domain)/PF18511 (F-box)/PF13516 (Leucine Rich repeat)
miR393b-5p	2	Ma06_g18000	transport inhibitor response 1-like protein	PF18791 (Transport inhibitor response 1 protein domain)/PF18511 (F-box)/PF13516 (Leucine Rich repeat)
miR529-5p	3,5	Ma04_g03420	zinc finger protein ZAT4-like	PF13912 (C2H2-type zinc finger)
miR529-5p	3,5	Ma04_g03420	zinc finger protein ZAT4-like	PF13912 (C2H2-type zinc finger)
miR157b-5p			No results	
miR169g			No results	
miR171b-3p			No results	
miR171l-5p			No results	
miR391-5p			No results	
miR482b-5p			No results	

**Tabela suplementar 4- Continuação**

miRNA	GO_ID	3DAI_NI R1	3DAI_NI R2	3DAI_NI R3	3DAI_I R1	3DAI_I R2	3DAI_I R3	12DAI_N I R1	12DAI_N I R2	12DAI_N I R3	12DAI_I R1	12DAI_I R2	12DAI_I R3
miR390 a-5p	GO:0003677,GO:0042023	421	634	100	282	143	140	557	1482	899	532	745	991
miR211 8-5p	GO:0043531	3	6	7	1	0	0	2	4	3	2	8	3
miR319- 5p	GO:0003700,GO:0003677	483	904	320	400	268	298	566	751	470	294	844	976
miR166 a-3p	GO:0003700,GO:0003677,GO:00082 89,	272	531	186	258	168	195	379	505	301	210	523	654
miR166 a-5p	GO:0003700,GO:0003677,GO:00082 89,	5060	6220	2274	3008	1652	1942	3970	6359	2852	2490	4788	6049
miR166 a-5p	GO:0003700,GO:0003677,GO:00082 89,	5620	7015	2815	3453	1984	2291	4685	6980	3324	2898	5443	6714
miR166 c-5p	GO:0003700,GO:0003677,GO:00082 89,	5620	7015	2815	3453	1984	2291	4685	6980	3324	2898	5443	6714
miR166 c-5p	GO:0003700,GO:0003677,GO:00082 89,	5628	7014	2815	3457	1984	2295	4692	6996	3335	2909	5453	6727
miR166 c-5p	GO:0003700,GO:0003677,GO:00082 89,	15922	16232	6430	8637	5132	6876	13167	21391	9179	7558	15515	20475
miR166 c-5p	GO:0003700,GO:0003677,GO:00082 89,	16293	16650	6627	8879	5340	7060	13557	21777	9460	7826	15955	20979
miR166 c-5p	GO:0003700,GO:0003677,GO:00082 89,	15956	16254	6441	8651	5154	6893	13225	21467	9218	7581	15576	20571
miR166 c-5p	GO:0003700,GO:0003677,GO:00082 89,	15247	15383	5896	8155	4792	6498	12429	20687	8632	7108	14769	19722
miR166 c-5p	GO:0003700,GO:0003677,GO:00082 89,	556	442	297	279	174	256	461	892	360	275	665	873
miR166 c-5p	GO:0003700,GO:0003677,GO:00082 89,	676	550	356	329	209	296	531	981	444	324	768	997
miR166 c-5p	GO:0003700,GO:0003677,GO:00082 89,	15408	15459	5914	8213	4809	6569	12511	20847	8735	7162	14908	19861
miR166 c-5p	GO:0003700,GO:0003677,GO:00082 89,	15071	15255	5825	8079	4743	6412	12285	20515	8521	7054	14616	19598
miR166 c-5p	GO:0003700,GO:0003677,GO:00082 89,	15405	15401	5911	8193	4805	6566	12506	20832	8731	7162	14904	19842
miR166 c-5p	GO:0003700,GO:0003677,GO:00082 89,	15408	15457	5914	8213	4809	6568	12511	20846	8735	7161	14907	19861

miR166 c-5p	GO:0003700,GO:0003677,GO:0008289,	15924	16235	6428	8637	5133	6877	13168	21397	9180	7558	15517	20476
miR166 c-5p	GO:0003700,GO:0003677,GO:0008289,	15408	15454	5914	8212	4809	6567	12508	20845	8738	7163	14906	19862
miR166 c-5p	GO:0003700,GO:0003677,GO:0008289,	15076	15259	5827	8080	4744	6414	12285	20515	8522	7055	14615	19597
miR166 c-5p	GO:0003700,GO:0003677,GO:0008289,	16094	16498	6530	8739	5189	6947	13279	21566	9292	7621	15701	20698
miR166 e-3p	GO:0003700,GO:0003677,GO:0008289,	15920	16229	6428	8638	5130	6876	13169	21390	9179	7558	15515	20469
miR390 a-5p	GO:0004672,GO:0005524,GO:0006468	15932	16192	6428	8626	5132	6884	13179	21415	9192	7574	15537	20489
miR390 a-5p	GO:0004672,GO:0005524,GO:0006468	16113	16435	6526	8741	5209	6964	13312	21576	9326	7636	15757	20717
miR390 a-5p	GO:0004672,GO:0005524,GO:0006468	16369	16418	6491	8817	5167	7077	13523	21753	9461	7735	16137	21407
miR390 a-5p	GO:0004672,GO:0005524,GO:0006468	931	1226	286	524	274	362	892	1230	600	608	848	1227
miR162 a-5p	GO:0008194	931	1225	285	524	274	362	892	1230	600	608	848	1228
miR162 a-5p	GO:0008194	931	1225	285	524	274	362	892	1230	600	608	848	1227
miR162 a-5p	GO:0008194	821	977	232	424	234	324	828	1086	505	544	760	1108
miR162 a-5p	GO:0008194	95982	103047	51150	53833	58417	61208	141546	145936	79962	77596	116790	125787
miR162 a-5p	GO:0008194	95272	101852	50391	53127	57896	60802	140621	144980	79294	77167	116001	124918
miR162 a-5p	GO:0008194	9513	16191	6884	4906	6235	4349	5353	9048	4497	4146	3926	4558
miR319 d-5p	GO:0008194	9507	16176	6876	4899	6224	4344	5343	9033	4492	4142	3919	4555
miR159 a-5p		235	391	213	193	259	229	413	585	264	352	431	476
miR159 a-5p		271	421	231	215	274	250	448	633	286	378	467	514
miR159 b-5p		263	420	230	212	273	253	443	629	286	377	462	510
miR159 b-5p		21	22	9	7	6	10	12	10	8	9	9	14

miR159 c-3p		274	330	192	121	73	82	102	229	165	147	167	132
miR159 c-3p		278	332	191	122	75	85	101	227	166	148	168	132
miR159 c-3p		244	295	177	106	61	72	83	208	140	130	146	117
miR535 d-5p	GO:0003735,GO:0005840,GO:0006412	271	320	187	114	72	82	98	226	162	147	166	131
miR530 a-5p	GO:0003735,GO:0006412,GO:0015934	85	93	52	35	34	27	57	107	75	50	94	59
miR395 a-3p	GO:0008271,GO:0008272,GO:0016020,GO:0055085	277	330	191	120	75	84	101	227	165	147	167	132
miR395 a-5p	GO:0008271,GO:0008272,GO:0016020,GO:0055085	7	0	0	1	2	6	4	4	8	3	1	3
miR395 a-5p	GO:0008271,GO:0008272,GO:0016020,GO:0055085	32	34	16	12	10	4	9	29	8	9	7	14
miR399 b-3p	GO:0004672,GO:0006468,GO:0005524	3	6	1	4	0	0	0	2	2	0	0	1
miR391- 5p	GO:0005515	10902	9568	8290	7977	6172	8029	9554	11544	9475	8580	12584	12682
miR397 a-5p	GO:0005643,GO:0006913,GO:0017056	10968	9644	8346	8026	6207	8079	9605	11626	9516	8602	12631	12759
miR535 a-5p	GO:0003677	10969	9645	8348	8026	6207	8078	9605	11626	9516	8603	12632	12759
miR535 a-5p	GO:0003677	10970	9644	8346	8026	6207	8079	9605	11626	9516	8602	12631	12759
miR535 a-5p	GO:0003677	3987	2771	2428	2646	1747	2947	3684	3612	4131	3207	5198	4972
miR535 a-5p	GO:0003677	10823	9574	8290	7987	6168	8000	9498	11554	9455	8558	12541	12646
miR535 a-5p	GO:0003677	1385	1866	833	754	385	578	490	1442	680	693	918	1023
miR535 a-5p	GO:0003677	1350	1809	802	730	378	557	484	1425	661	668	897	987
miR535 a-5p	GO:0003677	1410	1850	881	750	403	601	516	1422	687	710	933	1013
miR169- 5p	GO:0003700,GO:0006355	154	266	178	101	127	84	108	155	103	105	96	103
miR169l	GO:0003700,GO:0006355	1383	1870	835	752	386	578	490	1445	679	692	917	1023

miR169l-5p	GO:0003700,GO:0006355	1321	1782	794	713	369	551	471	1384	650	660	873	963
miR169l-5p	GO:0003700,GO:0006355	202	317	234	118	149	112	122	182	116	138	117	118
miR408b-5p	GO:0009055	657	915	707	508	505	390	476	480	602	438	415	459
miR528-5p	GO:0004672,GO:0006468,GO:0005524	658	916	711	509	506	391	476	481	602	440	416	458
miR172-5p	GO:0003700,GO:0006355	259	238	175	138	72	109	142	224	97	141	167	177
miR172-5p	GO:0003700,GO:0006355	30428	30421	21079	11338	11401	11687	10995	22417	14884	12287	15505	15762
miR172a-5p	GO:0003700,GO:0006355	30596	33093	22500	13486	11922	12151	11849	23699	15180	12480	15901	16777
miR172a-5p	GO:0003700,GO:0006355	30390	30324	21058	11344	11292	11709	10795	22162	14806	12271	15302	15634
miR172a-5p	GO:0003700,GO:0006355	153129	122204	65213	63842	57306	64072	123245	148962	101945	81632	151784	161363
miR172a-5p	GO:0003700,GO:0006355	137446	110458	58017	59341	51622	57248	111249	136569	91590	71661	136599	148790
miR172a-5p	GO:0003700,GO:0006355	136945	108768	57032	58357	51163	56796	110536	135322	91206	71428	136213	147630
miR172a-5p	GO:0003700,GO:0006355	136750	107324	56311	56972	50850	56581	110082	134760	90941	71224	135797	147311
miR172a-5p	GO:0003700,GO:0006355	137444	110457	58016	59341	51621	57248	111248	136568	91590	71661	136596	148788
miR172a-5p	GO:0003700,GO:0006355	153672	125204	66902	66137	58037	64696	124251	150592	102485	81978	152466	162660
miR172a-5p	GO:0003700,GO:0006355	136298	106605	55936	56633	50546	56414	109719	134157	90617	70995	135449	146862
miR172a-5p	GO:0003700,GO:0006355	136338	106665	55945	56617	50570	56412	109767	134208	90636	71017	135453	146926
miR172c-5p	GO:0003700,GO:0006355	152527	121337	64780	63401	56953	63836	122739	148186	101506	81312	151297	160754
miR172e-3p	GO:0003700,GO:0006355	137399	110407	58045	59359	51618	57239	111218	136455	91523	71640	136535	148626
miR160	GO:0003677,GO:0005634,GO:0006355,GO:0009725	137447	110469	58025	59357	51621	57250	111247	136574	91590	71658	136599	148791
miR160b-5p	GO:0003677,GO:0005634,GO:0006355,GO:0009725	137010	109929	57644	59056	51323	57093	110956	136093	91292	71426	136235	148318

miR160 b-5p	GO:0003677,GO:0005634,GO:0006355,GO:0009725	137458	110469	58050	59397	51636	57257	111288	136521	91567	71666	136577	148702
miR160 b-5p	GO:0003677,GO:0005634,GO:0006355,GO:0009725	136955	108782	57041	58372	51168	56803	110543	135347	91211	71434	136223	147647
miR160 b-5p	GO:0003677,GO:0005634,GO:0006355,GO:0009725	136790	107297	56284	57064	50761	56626	109970	134644	90916	71237	135667	147297
miR160 b-5p	GO:0003677,GO:0005634,GO:0006355,GO:0009725	137446	110475	58026	59357	51620	57251	111248	136575	91591	71660	136601	148791
miR160 b-5p	GO:0003677,GO:0005634,GO:0006355,GO:0009725	1066	1075	594	576	559	534	933	1076	754	569	1012	962
miR160 e-5p	GO:0003677,GO:0005634,GO:0006355,GO:0009725	66648	70526	34352	42971	25295	37582	55205	70722	50158	45540	67523	89919
miR160 h-3p	GO:0003677,GO:0005634,GO:0006355,GO:0009725	1936	3078	1674	1508	822	1029	1268	1387	1222	1349	1543	1690
miR160 h	GO:0003677,GO:0005634,GO:0006355,GO:0009725	1936	3078	1674	1508	822	1029	1268	1387	1222	1349	1543	1690
miR164 b-5p	GO:0004553,GO:0005975	1936	3078	1674	1508	822	1029	1268	1387	1222	1349	1543	1690
miR164 b-5p	GO:0004553,GO:0005975	67326	72582	34901	43667	25891	37920	55919	71520	50756	45980	68226	90676
miR164 b-5p	GO:0004553,GO:0005975	66869	70791	34520	43172	25479	37722	55450	70997	50382	45734	67843	90248
miR164 b-5p	GO:0004553,GO:0005975	67314	72572	34892	43656	25877	37903	55905	71503	50754	45983	68213	90651
miR164 b-5p	GO:0004553,GO:0005975	66954	71125	34661	43371	25618	37788	55567	71120	50445	45766	67936	90364
miR164 c-5p	GO:0004553,GO:0005975	36	37	22	26	14	18	21	27	18	24	40	52
miR167 a-5p	GO:0003677,GO:0005634,GO:0006355,GO:0009725	1977	3133	1698	1538	843	1063	1307	1432	1256	1371	1600	1753
miR167 a-5p	GO:0003677,GO:0005634,GO:0006355,GO:0009725	66881	70806	34535	43183	25495	37740	55465	71017	50388	45734	67863	90273
miR167 a-5p	GO:0003677,GO:0005634,GO:0006355,GO:0009725	66908	70892	34559	43224	25511	37750	55503	71066	50408	45747	67896	90319
miR167 a-5p	GO:0003677,GO:0005634,GO:0006355,GO:0009725	66868	70794	34520	43173	25479	37722	55450	70997	50382	45733	67844	90248
miR167 a-5p	GO:0003677,GO:0005634,GO:0006355,GO:0009725	5458	5598	1882	3323	2072	2782	7903	8404	6004	4296	7404	10817
miR167 a-5p	GO:0003677,GO:0005634,GO:0006355,GO:0009725	5814	6657	2693	3136	2166	3247	6157	7913	4978	3557	6052	8543

miR167 a-5p	GO:0003677,GO:0005634,GO:0006355,GO:0009725	6215	7234	2919	3334	2300	3462	6574	8632	5316	3798	6490	9247
miR167 a-5p	GO:0003677,GO:0005634,GO:0006355,GO:0009725	7023	8124	3447	3883	2656	3858	7143	11889	6124	4412	7579	11153
miR167 a-5p	GO:0003677,GO:0005634,GO:0006355,GO:0009725	7875	8691	3944	4212	3079	4297	7770	13029	6536	4863	8266	12024
miR167 a-5p	GO:0003677,GO:0005634,GO:0006355,GO:0009725	7743	8572	3820	4119	2987	4191	7628	12834	6453	4769	8116	11860
miR167 a-5p	GO:0003677,GO:0005634,GO:0006355,GO:0009725	7819	8638	3896	4188	3055	4267	7722	12888	6483	4835	8219	11932
miR167 a-5p	GO:0003677,GO:0005634,GO:0006355,GO:0009725	1171	1427	727	752	483	590	987	3793	1110	883	1484	2493
miR167 a-5p	GO:0003677,GO:0005634,GO:0006355,GO:0009725	6794	7354	3195	3488	2594	3664	6843	9432	5484	4060	6865	9626
miR167 b-5p	GO:0003677,GO:0005634,GO:0006355,GO:0009725	7683	8517	3778	4100	2965	4166	7587	12699	6401	4742	8062	11778
miR156 a	GO:0003677	0	1	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0
miR156 e-5p	GO:0003677	12	3	1	14	7	1	3	3	5	11	6	4
miR156 e-5p	GO:0003677	5	20	11	11	8	6	6	4	9	8	5	2
miR157 b-5p	GO:0003677	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0
miR157 b-5p	GO:0003677	0	3	1	1	2	1	1	0	0	0	0	0
miR157 b-5p	GO:0003677	0	3	1	1	2	1	2	0	0	0	0	0
miR529 b-5p	GO:0003677	78	129	99	73	60	31	38	50	37	56	38	21
miR529 b-5p	GO:0003677	207	315	170	147	128	133	157	264	100	106	133	194
miR156 b-5p	GO:0003677	207	313	173	150	129	133	157	263	100	108	132	193
miR156 b-5p	GO:0003677	78	129	99	73	60	31	38	50	37	56	38	21
miR156 b-5p	GO:0003677	211	315	177	151	136	133	156	259	99	105	131	196
miR156 b-5p	GO:0003677	11	14	5	16	7	23	10	20	5	2	13	42

miR156 b-5p	GO:0003677	211	314	177	151	136	133	156	259	99	105	131	196
miR156 b-5p	GO:0003677	1304	1795	686	665	583	739	944	1532	597	553	854	1463
miR156 e-5p	GO:0003677	1274	1706	663	581	546	699	890	1487	574	527	795	1395
miR156 e-5p	GO:0003677	1270	1703	665	582	545	699	891	1487	574	527	796	1394
miR156 e-5p	GO:0003677	3	8	4	3	4	1	5	2	2	2	3	1
miR156 e-5p	GO:0003677	3	3	0	0	2	3	2	6	2	0	0	4
miR156 e-5p	GO:0003677	10191	9916	8064	5459	5669	5173	5983	8162	7267	9614	8455	6552
miR156 e-5p	GO:0003677	12665	11805	9420	6689	6692	6641	7613	10162	8867	11093	10763	8741
miR156 e-5p	GO:0003677	10291	9955	8094	5492	5729	5223	6104	8266	7364	9681	8595	6669
miR156 e-5p	GO:0003677	10290	9954	8100	5490	5727	5223	6102	8270	7362	9680	8594	6674
miR156 e-5p	GO:0003677	36	38	32	15	20	17	24	31	33	36	27	22
miR156 e-5p	GO:0003677	2	2	0	0	0	2	0	1	1	1	0	1
miR156 e-5p	GO:0003677	4171	3661	2637	2123	1937	2287	2651	3254	2721	3031	3694	3295
miR156 e-5p	GO:0003677	3530	6846	5424	2450	2647	1663	2874	1351	1893	1657	2227	1567
miR156 e-5p	GO:0003677	3669	7122	5578	2594	2742	1745	2983	1455	1979	1731	2346	1687
miR156 e-5p	GO:0003677	3571	6874	5485	2477	2685	1691	2907	1395	1924	1682	2262	1605
miR156 e-5p	GO:0003677	3534	6849	5428	2454	2651	1666	2875	1354	1900	1658	2224	1580
miR156 e-5p	GO:0003677	3523	6857	5433	2457	2675	1675	2878	1354	1889	1666	2226	1562
miR171- 5p		3523	6857	5433	2457	2675	1675	2878	1354	1889	1666	2226	1562
miR171- 5p		3532	6844	5416	2450	2643	1665	2868	1350	1893	1656	2222	1569

miR171-5p		3530	6850	5426	2450	2647	1663	2873	1350	1895	1658	2224	1569
miR171-5p		3530	6849	5421	2447	2643	1664	2873	1345	1887	1657	2221	1568
miR171-5p		3541	6856	5432	2451	2659	1670	2889	1353	1911	1668	2245	1591
miR171a-5p		3535	6853	5417	2449	2648	1663	2870	1351	1890	1661	2232	1571
miR171a-5p		3564	6925	5449	2498	2656	1684	2899	1399	1915	1690	2240	1604
miR171a-5p		448	926	713	343	384	241	365	206	232	218	307	223
miR171c-3p		12	36	26	11	17	4	13	7	4	8	9	7
miR171e-5p		1000	536	349	284	191	488	785	925	999	659	1212	1528
miR171e-5p		7	7	3	1	1	1	1	2	0	2	0	0
miR171e-5p		55	76	36	27	44	37	70	60	48	62	56	67
miR171e-5p		4	2	2	3	1	5	6	4	6	5	3	4
miR171f-5p		14	30	18	16	10	10	16	19	10	12	19	14
miR171f-5p		568	516	451	218	228	195	227	339	310	335	283	228
miR319c-5p	GO:0003700	16	28	16	15	7	3	11	11	7	14	18	7
miR169-5p	GO:0005643,GO:0006913,GO:0017056	10	31	7	14	9	4	7	9	4	12	12	9
miR168b-5p	GO:0003676	18	31	12	21	9	6	10	15	12	15	16	9
miR396a-5p	GO:0005524,GO:0005634,GO:0006355	39	34	23	17	10	12	29	37	13	17	22	25
miR396a-5p	GO:0005524,GO:0005634,GO:0006355	2057	1647	378	855	593	727	1966	1666	915	963	1194	1584
miR396a-5p	GO:0005524,GO:0005634,GO:0006355	64	114	44	29	69	46	106	61	47	36	57	61
miR396a-5p	GO:0005524,GO:0005634,GO:0006355	1136	1578	921	555	1305	666	1972	1065	710	718	1036	1320

miR396 a-5p	GO:0005524,GO:0005634,GO:0006355	61	77	42	24	57	45	97	55	38	33	54	54
miR396 a-5p	GO:0005524,GO:0005634,GO:0006355	1136	1579	922	553	1305	667	1971	1059	707	718	1036	1320
miR396 a-5p	GO:0005524,GO:0005634,GO:0006355	1195	1690	986	593	1390	699	2090	1107	766	762	1109	1377
miR396 a-5p	GO:0005524,GO:0005634,GO:0006355	1153	1620	930	564	1320	671	1983	1064	716	729	1040	1343
miR396 a-5p	GO:0005524,GO:0005634,GO:0006355	53	29	67	78	39	66	39	67	26	60	124	104
miR396 a-5p	GO:0005524,GO:0005634,GO:0006355	56	28	67	77	41	69	40	69	24	63	130	111
miR396 a-5p	GO:0005524,GO:0005634,GO:0006355	53	29	67	78	40	66	39	67	27	60	124	105
miR396 b-5p	GO:0005524,GO:0005634,GO:0006355	22876	20926	14720	9116	9760	10230	8893	7865	6902	8290	6786	5858
miR396 b-5p	GO:0005524,GO:0005634,GO:0006355	189	140	107	111	125	128	174	73	99	288	91	78
miR396 b-5p	GO:0005524,GO:0005634,GO:0006355	40859	27844	17685	12448	14396	16031	22569	23859	15653	15859	21757	22531
miR164 b-5p	GO:0005524,GO:0035299	34084	23427	14615	9626	12113	12940	18771	18878	11708	12489	16600	17883
miR164 b-5p	GO:0005524,GO:0035299	1778	1701	972	799	659	728	624	1085	811	829	763	860
miR171- 5p		40842	27829	17663	12444	14385	16025	22542	23842	15643	15851	21748	22516
miR171- 5p		23061	21255	14949	9301	9871	10437	9008	8009	7038	8416	6877	5938
miR164 c-5p		22886	20967	14716	9113	9762	10237	8899	7879	6904	8289	6796	5864
miR164 c-5p		22853	20889	14686	9080	9740	10219	8881	7849	6883	8277	6774	5844
miR396 a-5p	GO:0005524,GO:0005634,GO:0006355	22833	20946	14635	9093	9732	10187	8875	7854	6853	8229	6750	5843
miR396 a-5p	GO:0005524,GO:0005634,GO:0006355	23771	22805	15679	9906	10559	10878	9801	8514	7561	8932	7344	6280
miR396 a-5p	GO:0005524,GO:0005634,GO:0006355	187	139	106	110	125	127	174	73	98	287	91	78
miR393 a-5p	GO:0005515	22861	20917	14705	9107	9755	10223	8891	7860	6898	8284	6780	5850

miR398 a-5p	GO:0005515	7867	6953	6166	4894	5066	4538	3923	3244	4410	4497	3742	2854
miR827- 5p		7760	6662	6012	4748	4979	4427	3862	3129	4281	4415	3681	2785
miR143 2-5p		7758	6662	6012	4748	4979	4427	3862	3129	4281	4415	3681	2785
miR168 b-5p	GO:0005515, GO:0003676,	7580	6514	5804	4613	4846	4315	3756	3034	4152	4298	3572	2679
miR168 b-5p	GO:0005515, GO:0003676,	1569	272	744	2605	567	254	4558	2037	2366	1756	2531	2385
miR168 b-5p	GO:0005515, GO:0003676,	1487	303	880	2492	1278	440	4002	4104	3161	1571	2856	2818
miR168 b-5p	GO:0005515, GO:0003676,	1	1	13	28	14	2	7	0	2	7	1	1
miR168 b-5p	GO:0005515, GO:0003676,	3623	814	902	3559	1671	610	5323	5625	3844	2024	4371	6352
miR168 b-5p	GO:0005515, GO:0003676,	4696	5374	3524	2940	2420	2534	4519	9164	5184	4683	5594	6498
miR168 b-5p	GO:0005515, GO:0003676,	5951	1041	949	3788	1858	1078	9113	14582	5358	2754	6591	9905
miR168 b-5p	GO:0005515, GO:0003676,	0	5	1	1	5	1	1	1	2	2	2	7
miR393 b-5p	GO:0005515	0	5	1	1	5	1	1	1	2	2	2	7
miR393 b-5p	GO:0005515	1	7	2	1	8	3	3	8	3	4	4	43
miR393 b-5p	GO:0005515	1	7	2	1	8	3	3	8	3	4	4	43
miR393 b-5p	GO:0005515	601	996	515	74	355	275	302	273	274	183	190	266
miR393 b-5p	GO:0005515	42732	34919	20317	18390	10715	20185	26963	42961	18383	19008	30888	40212
miR529- 5p		41937	30858	17713	15995	9663	19306	25155	41423	17267	18421	29609	38621
miR529- 5p		42690	34881	20307	18374	10700	20165	26930	42941	18351	18984	30854	40179
miR157 b-5p		42843	35032	20383	18448	10784	20250	27085	43053	18516	19094	30942	40316
miR169 g		41948	30953	17547	15964	9596	19293	25156	41444	17267	18415	29617	38630

miR171 b-3p	41976	31091	17564	15992	9609	19308	25189	41489	17287	18422	29629	38638
miR171l -5p	42642	31664	18267	16549	9985	19852	25971	42203	17833	18772	30464	39659
miR391- 5p	11431	8257	4209	4713	2824	5348	7919	18971	6204	5858	10309	15291
miR482 b-5p	1497	2210	2416	1798	5467	1161	5358	1939	1553	1859	2985	2348

**Tabela suplementar 5.** Informações de todas as sequências dos novos miRNAs em *Musa*.

miRNA	Mature sequence	MiRNA-star sequence	mireap coordinate	Shortstack coordinate	Length of mature miRNA	Pre_miRNA length (by mireap)	Total counts	Pre_miRNA sequence (by mireap)	Shortstack classification	Secondary Structure
Novel_1	ATCGAACCGACTCGGACGAGT	CCGTCCGAGTCGGCTCGAGA	chr01:7155047:7155223	chr01:7155037-7155231	21	177	22	ACGTATAAT	Y	Supp. Figure 1
Novel_2	TCTTTTGCCTGTTCTCTCATC	TGAGAGAAAGCAAAGAGAAG	chr05:5132735:5132813	chr05:5132725-5132822	22	79	25	GCCTTCTCT	Y	Supp. Figure 1
Novel_3	TTCTCAGGGCTTTCACGATG	TCGTGAAGCCGTTGAGGAAGG	chr07:20901128:20901230	Chr07:20901118-20901239	21	103	6161	GTCTCTTGAC	Y	Supp. Figure 1
Novel_4	TCGACAAGTTGACAGTAGTAG	ACTGCTGTCAACTTGTTGATG	chr08:3639255:3639448	-	21	194	18	ACGCCACCC	Y	Supp. Figure 1
Novel_5	TTGAAACAGAACTCGGCCAGC	CCGAGTTGTGTTCAAGAAAC	chr10:34402590:34402681	chr10:34402575-34402688	21	92	121	AAAAGGCTGGC	Y	Supp. Figure 1
Novel_6	TCTGCCCTGCCTCGTTCTCC	AGACGGAGGCTGGGGAGGAGG	-	chr09:11246762-11246882	21	82	143	CCACGGGA	Y	Supp. Figure 1
Novel_7	TGTGGTTCATGTGAGTAGTAC	TGTGGTTCATGTGAGTAGTA	-	Chr09:34735648-34735758	21	180	3647	AGCCCTAAC	Y	Supp. Figure 1
Novel-5p_8	TCGACGTAGATGTAGAGTGAC	-	chr01:3237626:3237740	-	21	115	11	GAGAGGTG	N15	Supp. Figure 1
Novel-5p_9	TTAGCTGATTGTGGTGTATCC	-	chr01:7762935:7763039	-	22	105	168	ATTATTTGAC	N15	Supp. Figure 1
Novel-3p_10	TCACTTTCGTGTCGATCTAGC	-	chr02:15328566:15328749	-	22	184	7	GTGACACCA	N15	Supp. Figure 1
Novel-5p_11	TGATGTGTTATTTCTACGGAA	-	chr02:22236894:22237044	-	22	151	13	TAAAGTAAT	N15	Supp. Figure 1
Novel-5p_12	TGAATTAATTTAAAGGGTGT	-	chr02:27471405:27471507	-	22	103	6	CTATTGACA	N15	Supp. Figure 1
Novel-5p_13	TGGTTGACGTTGGTCGGGATC	-	chr04:10607231:10607336	-	21	106	5	GAAGGTGTC	N15	Supp. Figure 1
Novel-5p_14	TTTAGTTTGAAGATAGGAATG	-	chr04:30762245:30762347	-	21	103	5	GATATAGTA	N15	Supp. Figure 1
Novel-5p_15	TCAATGGTGATGAAATGTT	-	chr05:22232500:22232644	-	20	145	5	TTGGATCTAT	N15	Supp. Figure 1
Novel-5p_16	CAAAGACGGAGTTATTGGATG	-	chr05:25109802:25109949	-	21	148	3	CGAAAAATT	N15	Supp. Figure 1
Novel-3p_17	TGTCTGATAGACTTGCTCGCC	-	chr08:39270564:39270717	-	21	154	4	TGCAATTGCC	N15	Supp. Figure 1
Novel-3p_18	TCCCGGTCTCTGCGTGCTGG	-	chr09:4039767:4039867	-	21	101	9	ATAGTAATA	N15	Supp. Figure 1
Novel-3p_19	TTCATAAGTATAGGGATCTCA	-	chr09:40438631:40438862	-	21	232	4	AAAAATTAT	N15	Supp. Figure 1
Novel-3p_20	TAGAGACCACATGATGGACGG	-	chr10:26852029:26852146	-	21	118	3	TCCCTCCAA	N15	Supp. Figure 1
Novel-3p_21	GTAACATAGAGATCTCAATAT	-	chr11:2322440:2322581	-	22	142	3	TTTAAATATT	N15	Supp. Figure 1
Novel-3p_22	AGGATGAGGGTTTGTGTCTC	-	chr11:5710224:5710366	-	21	143	35	AATGATGGG	N15	Supp. Figure 1
Novel-3p_23	ATAGGTGGTCTATTAGAACAT	GTTCTAATAGATCATCTACTC	chr07:33555721-33555990	-	21	150	4916	CTTTCCTTTT	Y	Supp. Figure 1
Novel-3p_24	AGCTGGGGTCGTCGGAGCTC	-	-	chr07:1353404-1353488	21	159	44	CTCAACCCA	N15	Supp. Figure 1

**Tabela suplementar 5.** Informações de todas as sequências dos novos miRNAs em *Musa*. Continuação

Target	PFAM ID	GO ID	3DAI _NI_ R1	3DAI _NI_ R2	3DAI _NI_ R3	3DA I_I_ R1	3DA I_I_ R2	3DA I_I_ R3	12DA I_NI_ R1	12DA I_NI_ R2	12DA I_NI_ R3	12D AI_I R1	12D AI_I R2	12D AI_I R3
Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 26b	PF08711 (Med26)	GO:0005634 (nucleus)	1	4	0	2	0	1	1	1	2	2	2	6
pollen-specific leucine-rich repeat extensin-like protein 3	PF07983 (X8 domain)		3	0	0	6	2	2	0	1	3	5	3	0
Interferon-related developmental regulator	PF05004 (Interferon-related developmental regulator (IFRD))	-	820	200	48	116 0	269	289	180	115	618	748	401	1313
piRNA biogenesis protein EXD1	PF01612 (3'-5' exonuclease); PF00013 (KH domain)	GO:0003676 GO:0006139 GO:0008408 GO:0003723	4	4	0	1	1	2	1	1	1	1	0	2
F-box/kelch-repeat protein	PF00646 (F-box); PF01344 (Kelch_1); PF07646 (Kelch_2)	GO:0005515 (protein binding)	9	11	6	20	4	6	7	1	14	10	13	20
desumoylating isopeptidase 2-like, transcript variant X2	(PF05903 (PPPDE putative peptidase domain 3)	GO:0008233	9	23	8	14	5	6	5	5	8	16	20	24
zinc finger protein ZAT11-like	PF13912 (C2H2-type zinc finger)	-	320	497	250	405	178	235	221	203	422	402	302	212
Galacturonosyltransferase 8	PF01501 (Glycosyl transferase family 8)	GO:0016757	1	2	0	2	1	0	0	0	1	1	1	2
Ribulose-phosphate 3-epimerase	PF00834 (Ribulose-phosphate 3 epimerase family)	GO:0005975 GO:0016857	8	24	22	6	7	11	20	16	25	8	12	9
60S ribosomal protein L10a	PF00687 (Ribosomal protein L1p/L10e family)	-	1	0	0	1	3	0	1	0	0	1	0	0

Protein SPA, chloroplastic long chain acyl-CoA synthetase 4-like	PF17302 (Family of unknown function (DUF5351))		3	0	2	1	0	1	0	2	2	1	1	0
	PF00501 (AMP-binding enzyme)		0	0	0	2	0	0	0	4	0	0	0	0
Noroxomaritidine synthase	PF00067 (Cytochrome P450)	GO:0004497 GO:0005506 GO:0016705 GO:0020037	2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
transcription factor MYB1R1-like	PF00249 (Myb-like DNA-binding domain)		0	2	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0
Putative disease resistance protein RGA1	PF00931 (NB-ARC domain)	GO:0043531	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
Ethylene induced calmodulin-binding protein	PF00612 (IQ calmodulin-binding motif)/PF01833 (IPT/TIG domain)	GO:0005515	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
Peroxidase 25	PF00141 (Peroxidase)	GO:0004601 GO:0006979 GO:0020037	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
Homeobox-leucine zipper protein	PF00046 (Homeodomain)	GO:0003677	0	1	0	0	0	3	0	1	1	0	0	3
subtilisin-like protease SBT5.4	PF10584 (Proteasome subunit A N-terminal signature)	GO:0006511,GO:0019773	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	1	0
glutamate receptor 3.5-like	PF01094 (Receptor family ligand binding region)		0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
Galacturonosyltransferase 8	PF01501 (Glycosyl transferase family 8)	GO:0016757	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Galacturonosyltransferase 8	PF01501 (Glycosyl transferase family 8)	GO:0016757	0	18	3	1	0	1	5	1	2	1	3	0
Probable apyrase 7 serine/threonine-protein phosphatase 2A	PF01150 (GDA1/CD39 (nucleoside phosphatase) family)	GO:0016787	835	536	402	711	390	452	411	273	709	597	596	522
	PF02469 (Fasciclin domain)		2	11	2	2	1	0	4	5	5	2	4	8

**Tabela Suplementar 6. Expressão diferencial dos miRNAs em *Musa acuminata* entre os tratamentos inoculados em 3DAI e 12DAI.**

Mireap	Row.names	logFC	logCPM	F	PValue	FDR	3DAI I 1	3DAI I 2	3DAI I 3	12 DAI I 1	12 DAI I 2	12 DAI I 3	miRNA
allFiles-m0631/allFiles-m0748	Cluster_69983	2,181966	4,250126	149,7444	2,37E-12	2,03E-07	140	282	143	991	532	745	miR1432-5p
	Cluster_57304	1,189551	7,042966	43,94497	4,72E-07	0,000273	1942	3008	1652	6049	2490	4788	miR156b-5p
	Cluster_99601	1,51398	4,072359	46,35375	3,01E-07	0,000211	256	279	174	873	275	665	miR156e-5p
allFiles-m0333	Cluster_32740	1,262784	8,658959	45,1676	3,75E-07	0,000237	6498	8155	4792	19722	7108	14769	miR156e-5p
allFiles-m0438/allFiles-m0539	Cluster_53806	1,460522	4,495075	80,61629	1,75E-09	7,13E-06	324	424	234	1108	544	760	miR157b-5p
allFiles-m0135	Cluster_5665	1,378029	4,671362	70,79222	6,28E-09	1,56E-05	362	524	274	1227	608	848	miR157b-5p
allFiles-m0557	Cluster_56659	1,043675	11,67709	67,12841	1,05E-08	1,91E-05	60802	53127	57896	124918	77167	116003	miR159a-5p
	Cluster_55726	1,022058	3,806784	50,71065	1,38E-07	0,000126	253	212	273	510	377	462	miR159c-3p
allFiles-m0775	Cluster_73107	1,260865	1,047218	24,5823	3,66E-05	0,004301	27	35	34	59	50	94	miR160b-5p
allFiles-m0299	Cluster_28349	0,907501	2,090777	23,72736	4,61E-05	0,00507	72	106	61	117	130	146	miR160b-5p
	Cluster_119839	0,916928	2,262216	26,41531	2,26E-05	0,00305	82	114	72	131	147	166	miR160b-5p
	Cluster_58089	1,042312	7,11271	46,64141	2,85E-07	0,000205	2947	2646	1747	4972	3207	5198	miR162a-5p
allFiles-m0556	Cluster_56574	0,779106	8,546779	40,7772	8,77E-07	0,00041	8079	8026	6207	12759	8602	12631	miR162a-5p
allFiles-m0466	Cluster_37578	0,800013	4,845809	30,14604	8,97E-06	0,001678	578	754	385	1023	693	918	miR164b-5p
allFiles-m1192	Cluster_116100	0,780456	4,866477	30,65022	7,95E-06	0,001552	601	750	403	1013	710	933	miR164b-5p
allFiles-m0369/allFiles-m0461	Cluster_36655	0,433754	9,091784	18,27839	0,000224	0,014752	12151	13486	11922	16777	12480	15901	miR166a-5p
allFiles-m1790	Cluster_171519	1,273128	11,75623	70,79904	6,28E-09	1,56E-05	56412	56617	50570	146926	71017	135453	miR166c-5p
allFiles-m1716/allFiles-m1825	Cluster_187067	1,257708	11,91673	72,97784	4,67E-09	1,46E-05	63836	63401	56953	160754	81312	151297	miR166c-5p
allFiles-m0324	Cluster_31974	1,105509	10,99634	58,64591	3,73E-08	4,96E-05	37582	42971	25295	89919	45540	67523	miR167a-5p
allFiles-m0618	Cluster_68482	1,619634	7,672991	89,5277	6,03E-10	4,31E-06	2782	3323	2072	10817	4296	7404	miR167b-5p
	Cluster_125611	1,562956	5,467701	69,99106	7,02E-09	1,63E-05	590	752	483	2493	883	1484	miR168b-5p
	Cluster_53348	1,305956	7,795821	58,46186	3,84E-08	4,96E-05	3858	3883	2656	11153	4412	7579	miR168b-5p
allFiles-m0796	Cluster_76756	0,704571	4,899651	15,3554	0,00057	0,025894	699	582	545	1394	527	796	miR171a-5p

allFiles-m1766	Cluster_167958	0,788807	8,404435	44,92297	3,93E-07	0,00024	6641	6689	6692	8741	11093	10763	miR171e-5p
allFiles-m1485	Cluster_159230	0,831797	6,773163	52,5701	1,00E-07	0,000105	2287	2123	1937	3295	3031	3694	miR171l-5p
	Cluster_229230	0,576051	3,315099	13,2762	0,001163	0,040985	195	218	228	228	335	283	miR390a-5p
allFiles-m1092	Cluster_99177	0,834718	1,676801	12,63384	0,001462	0,04753	66	78	40	105	60	124	miR395a-5p
allFiles-m0029	Cluster_3749	0,33383	4,933344	10,16894	0,003676	0,083952	728	799	659	860	829	763	miR396a-5p
allFiles-m0092	Cluster_838	0,64278	9,419934	25,7556	2,69E-05	0,003434	16025	12444	14385	22517	15851	21748	miR396a-5p
	Cluster_29231	1,217834	6,054608	10,70074	0,002994	0,073824	254	2605	567	2385	1756	2531	miR397a-5p
	Cluster_227175	0,99749	6,240412	12,18919	0,001718	0,052495	440	2492	1278	2818	1571	2856	miR398a-5p
allFiles-m1027	Cluster_106836	2,15971	-1,03521	9,709395	0,004403	0,093447	3	1	8	43	4	4	miR529b-5p
allFiles-m1512/allFiles-m1621	Cluster_162738	1,108484	9,768206	39,80616	1,07E-06	0,000435	19293	15964	9596	38630	18415	29617	miR535a-5p
allFiles-m0416/allFiles-m0511	Cluster_50593	1,438821	8,200783	55,54752	6,12E-08	7,07E-05	5348	4713	2824	15291	5858	10309	miR535d-5p
allFiles-m1357	Cluster_127907	2,100497	4,207226	56,77165	5,02E-08	6,02E-05	269	180	115	1160	289	748	Novel_3
	Cluster_187431	0,959909	3,458938	34,89292	3,02E-06	0,000767	178	221	203	405	235	402	Novel_7
allFiles-m1826		0,798874	10,56622	12,46659	0,002357	0,098105	2534	2940	2420	4683	6498	5594	miR482b-5p
allFiles-m0437		1,491117	8,019669	21,29393	0,00021	0,035067	488	284	191	659	1528	1212	miR2118-5p

Article

## Characterization of microRNAs and Target Genes in *Musa acuminata* subsp. *burmannicoides*, var. Calcutta 4 during Interaction with *Pseudocercospora musae*

Erica Cristina Silva Rego<sup>1,†</sup>, Tatiana David Miranda Pinheiro<sup>1,†</sup>, Fernando Campos de Assis Fonseca<sup>2</sup>,  
Taisa Godoy Gomes<sup>1</sup>, Erica de Castro Costa<sup>1</sup>, Lucas Santos Bastos<sup>1</sup>, Gabriel Sergio Costa Alves<sup>1</sup>,  
Michelle Guitton Cotta<sup>1</sup>, Edson Perito Amorim<sup>3</sup>, Claudia Fortes Ferreira<sup>3</sup>, Roberto Coiti Togawa<sup>4</sup>,  
Marcos Mota Do Carmo Costa<sup>4</sup>, Priscila Grynberg<sup>4</sup> and Robert Neil Gerard Miller<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília 70910-900, DF, Brazil

<sup>2</sup> Department of Academic Areas, Instituto Federal de Goiás (IFG), Águas Lindas 72910-733, GO, Brazil

<sup>3</sup> Embrapa Cassava and Tropical Fruits, Cruz das Almas 44380-000, BA, Brazil

<sup>4</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, CP 02372, Brasília 70770-917, DF, Brazil

\* Correspondence: robertmiller@unb.br

† These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** Endogenous microRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that perform post-transcriptional regulatory roles across diverse cellular processes, including defence responses to biotic stresses. *Pseudocercospora musae*, the causal agent of Sigatoka leaf spot disease in banana (*Musa* spp.), is an important fungal pathogen of the plant. Illumina HiSeq 2500 sequencing of small RNA libraries derived from leaf material in *Musa acuminata* subsp. *burmannicoides*, var. Calcutta 4 (resistant) after inoculation with fungal conidiospores and equivalent non-inoculated controls revealed 202 conserved miRNAs from 30 miR-families together with 24 predicted novel miRNAs. Conserved members included those from families miRNA156, miRNA166, miRNA171, miRNA396, miRNA167, miRNA172, miRNA160, miRNA164, miRNA168, miRNA159, miRNA169, miRNA393, miRNA535, miRNA482, miRNA2118, and miRNA397, all known to be involved in plant immune responses. Gene ontology (GO) analysis of gene targets indicated molecular activity terms related to defence responses that included nucleotide binding, oxidoreductase activity, and protein kinase activity. Biological process terms associated with defence included response to hormone and response to oxidative stress. DNA binding and transcription factor activity also indicated the involvement of miRNA target genes in the regulation of gene expression during defence responses. sRNA-seq expression data for miRNAs and RNA-seq data for target genes were validated using stem-loop quantitative real-time PCR (qRT-PCR). For the 11 conserved miRNAs selected based on family abundance and known involvement in plant defence responses, the data revealed a frequent negative correlation of expression between miRNAs and target host genes. This examination provides novel information on miRNA-mediated host defence responses, applicable in genetic engineering for the control of Sigatoka leaf spot disease.

**Keywords:** *Musa acuminata*; *Pseudocercospora musae*; Sigatoka leaf spot; biotic stress; microRNAs; Illumina; stem-loop quantitative real-time PCR



Citation: Rego, E.C.S.; Pinheiro, T.D.M.; Fonseca, F.C.A.; Gomes, T.G.; Costa, E.d.C.; Bastos, L.S.; Alves, G.S.C.; Cotta, M.G.; Amorim, E.P.; Ferreira, C.F.; et al. Characterization of microRNAs and Target Genes in *Musa acuminata* subsp. *burmannicoides*, var. Calcutta 4 during Interaction with *Pseudocercospora musae*. *Plants* 2023, 12, 1473. <https://doi.org/10.3390/plants12071473>

Academic Editor: Cristina Cosatti

Received: 23 February 2023

Revised: 20 March 2023

Accepted: 24 March 2023

Published: 28 March 2023



Copyright © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### 1. Introduction

Banana (*Musa* spp.) is a monocotyledonous crop cultivated throughout tropical and subtropical regions, contributing to food security and poverty alleviation. The fruit crop, however, is susceptible to diseases due to sterility and a narrow genetic background.

The fungal pathogen *Pseudocercospora musae*, the causal agent of Sigatoka leaf spot disease, or yellow Sigatoka disease, is a member of the Sigatoka leaf spot complex, together



Article

# Transcriptome Profiling of the Resistance Response of *Musa acuminata* subsp. *burmannicoides*, var. Calcutta 4 to *Pseudocercospora musae*

Tatiana David Miranda Pinheiro <sup>1,†</sup>, Erica Cristina Silva Rego <sup>1,†</sup>, Gabriel Sergio Costa Alves <sup>1</sup>,  
Fernando Campos De Assis Fonseca <sup>2</sup>, Michelle Guitton Cotta <sup>1</sup>, Jose Dijair Antonino <sup>3</sup>, Taisa Godoy Gomes <sup>1</sup>,  
Edson Perito Amorim <sup>4</sup>, Claudia Fortes Ferreira <sup>4</sup>, Marcos Mota Do Carmo Costa <sup>5</sup>, Priscila Grynberg <sup>5</sup>,  
Roberto Coiti Tawara <sup>5</sup> and Robert Neil Gerard Miller <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília 70910-900, Brazil
- <sup>2</sup> Department of Academic Areas, Instituto Federal de Goiás (IFG), Águas Lindas 72910-733, Brazil
- <sup>3</sup> Departamento de Agronomia-Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife 52171-900, Brazil
- <sup>4</sup> Embrapa Cassava and Tropical Fruits, Cruz das Almas 44380-000, Brazil
- <sup>5</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, Brasília 70770-917, Brazil
- \* Correspondence: robertnmiller@unb.br
- † These authors contributed equally to this work.



Citation: Pinheiro, T.D.M.; Rego, E.C.S.; Alves, G.S.C.; Fonseca, F.C.D.A.; Cotta, M.C.; Antonino, J.D.; Gomes, T.G.; Amorim, E.P.; Ferreira, C.F.; Costa, M.M.D.C.; et al. Transcriptome Profiling of the Resistance Response of *Musa acuminata* subsp. *burmannicoides*, var. Calcutta 4 to *Pseudocercospora musae*. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 13589. <https://doi.org/10.3390/ijms232113589>

Academic Editor: Kaen Skriver

Received: 6 October 2022

Accepted: 31 October 2022

Published: 5 November 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Banana (*Musa* spp.), which is one of the world's most popular and most traded fruits, is highly susceptible to pests and diseases. *Pseudocercospora musae*, responsible for Sigatoka leaf spot disease, is a principal fungal pathogen of *Musa* spp., resulting in serious economic damage to cultivars in the Cavendish subgroup. The aim of this study was to characterize genetic components of the early immune response to *P. musae* in *Musa acuminata* subsp. *burmannicoides*, var. Calcutta 4, a resistant wild diploid. Leaf RNA samples were extracted from Calcutta 4 three days after inoculation with fungal conidiospores, with paired-end sequencing conducted in inoculated and non-inoculated controls using Illumina HiSeq 4000 technology. Following mapping to the reference *M. acuminata* ssp. *malaccensis* var. Pahang genome, differentially expressed genes (DEGs) were identified and expression representation analyzed on the basis of gene ontology enrichment, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes orthology and MapMan pathway analysis. Sequence data mapped to 29,757 gene transcript models in the reference *Musa* genome. A total of 1073 DEGs were identified in pathogen-inoculated cDNA libraries, in comparison to non-inoculated controls, with 32% overexpressed. GO enrichment analysis revealed common assignment to terms that included chitin binding, chitinase activity, pattern binding, oxidoreductase activity and transcription factor (TF) activity. Allocation to KEGG pathways revealed DEGs associated with environmental information processing, signaling, biosynthesis of secondary metabolites, and metabolism of terpenoids and polyketides. With 144 up-regulated DEGs potentially involved in biotic stress response pathways, including genes involved in cell wall reinforcement, PTI responses, TF regulation, phytohormone signaling and secondary metabolism, data demonstrated diverse early-stage defense responses to *P. musae*. With increased understanding of the defense responses occurring during the incompatible interaction in resistant Calcutta 4, these data are appropriate for the development of effective disease management approaches based on genetic improvement through introgression of candidate genes in superior cultivars.

**Keywords:** *Musa acuminata*; *Pseudocercospora musae*; Sigatoka leaf spot; biotic stress; disease resistance; transcriptome

## 1. Introduction

Banana (*Musa* spp.) is both the world's most important fruit crop and an important staple food in numerous countries given its high nutritional value [1]. Whilst wild *Musa*

- **RESUMO DE CONGRESSO – Plant and Animal Genome Conference (PAG), 2019, San Diego, EUA**



## PO0721: Characterization of microRNAs in *Musa acuminata* Induced during Interaction with *Pseudocercospora musae*

Endogenous microRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that regulate gene expression at the post-transcriptional level by cleavage or repression of mRNA translation. MiRNAs in plants regulate diverse cellular processes, including defense responses to biotic stresses. Banana (*Musa* spp.), a monocotyledonous crop cultivated throughout tropical regions, is susceptible to numerous diseases due to sterility and a narrow genetic background. *Pseudocercospora musae*, the causal agent of Sigatoka leaf spot disease, is an important fungal pathogen of banana, causing losses due to reduction in functional leaf area. Here, leaf RNA samples were extracted from *Musa acuminata* subsp. burmannicoides, var. Calcutta 4 (resistant), at 3 and 12 days after inoculation (DAI) with conidiospores. Following small RNA library construction, samples were sequenced using Illumina HiSeq 2500 technology. High quality sequences were mapped against the *M. acuminata* ssp. *malaccensis* var. Pahang reference genome and plant miRNAs were predicted using the programs Mireap and ShortStack. A total of 155 conserved miRNAs belonging to 29 miR-families were identified, together with 21 predicted novel miRNAs. At 3DAI, 12 miRNAs from six miR-families plus six novel miRNAs were significantly differentially expressed between inoculated and control samples. At 12DAI, similar numbers were observed, with 12 miRNAs from 10 different miR-families and three novel miRNAs regulated after inoculation. Potential host gene targets of miRNAs were predicted using TargetFinder. The characterization of miRNAs in *M. acuminata* and their role in gene expression modulation during interaction with *P. musae* provides resources for the development of efficient methods for control of Sigatoka leaf spot disease.

### Authors

Erica C. S. Rego

Universidade de Brasília

Tatiana D. M. Pinheiro

Universidade de Brasília

Fernando C. A. Fonseca

University of Brasília

Gabriel S. C. Alves

Universidade de Brasília

Edson Perito Amorim

Embrapa Cassava and Tropical Fruits

Claudia Fortes Ferreira

Embrapa Cassava and Tropical Fruits

Roberto C. Togawa

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Marcos M. C. Costa

- **RESUMO DE CONGRESSO – Plant and Animal Genome Conference (PAG), 2019, San Diego, EUA**

Characterization of Components of Genetic Resistance in the Pathosystem *Musa acuminata* - *Pseudocercospora musae*

13/02/23 20:13



## PE0720: Characterization of Components of Genetic Resistance in the Pathosystem *Musa acuminata* - *Pseudocercospora musae*

Banana (*Musa* spp.) is one of the world's most important crops. Whilst wild species are generally fertile, many commercial varieties are sterile. As a result of limited genetic variation, such cultivars are frequently susceptible to pests and diseases. Sigatoka leaf spot, caused by the fungal pathogen *Pseudocercospora musae*, leads to considerable yield losses in banana. Accessing the genomic information of fertile wild genotypes of *Musa* can improve our understanding of disease resistance mechanisms and serve as a guide to develop disease resistant cultivars. The aim of this study was to identify and characterize genetic components of resistance to *P. musae* in *Musa acuminata*. Leaf RNA samples were extracted from *M. acuminata* subsp. *burmannicoides* var. Calcutta 4 (resistant) at 3 and 12 days after inoculation (DAI) with fungal conidiospores, and paired-end sequenced using Illumina HiSeq 4000 technology. In this study 30,790 genes were mapped against the *M. acuminata* ssp. *malaccensis* var. Pahang reference genome. A total of 1,073 differentially expressed genes (DEGs) were identified at 3DAI, in relation to non-inoculated controls. Of these, 180 DEGs are potentially involved in disease resistance and defense responses to the fungus. Notable modulated transcripts related to stress responses included LRR receptor-like serine/threonine-protein kinases, pathogenesis related proteins, MYB and WRKY transcription factors, MAP kinases and endochitinases. DEGs identified as potentially involved in resistance responses and validated by RT-qPCR will contribute to the elucidation of disease resistance mechanisms, benefiting breeding programs for the development of resistant *Musa* genotypes.

### Presenting Author

**Tatiana D. M. Pinheiro**

*Universidade de Brasília*

### Authors

**Erica C. S. Rego**

*Universidade de Brasília*

**Fernando C. A. Fonseca**

*University of Brasília*

**Gabriel S. C. Alves**

*Universidade de Brasília*

**Edson Perito Amorim**

*Embrapa Cassava and Tropical Fruits*

**Claudia Fortes Ferreira**

*Embrapa Cassava and Tropical Fruits*

**Roberto C. Togawa**

*Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*

**Marcos M. C. Costa**

<https://pag.confex.com/pag/xxvii/meetingapp.cgi/Paper/33496>

Page 1 of 2

- **RESUMO DE CONGRESSO – Plant and Animal Genome Conference (PAG), 2019, San Diego, EUA**

Identification and Distribution of the Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repeat Gene Family in Musa

13/02/23 20:12



## PO0719: Identification and Distribution of the Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repeat Gene Family in Musa

Many commercial banana varieties (*Musa* spp.) are susceptible to pests and diseases, as a consequence of sterility and narrow genetic background. Fertile wild relatives possess greater diversity and represent potential sources of disease resistance genes (R-genes). The largest family of plant R-genes encode protein receptors of the nucleotide-binding, leucine-rich repeat class (NLR). Conserved motifs in such genes in diverse plant species offer a means for isolation of candidate genes in banana involved in plant immunity. A computational strategy was developed for conserved motif discovery in NLR domains in R-genes from the reference genome *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* (DH-Pahang) and homologues in the *Musa* genus. Reference genome sequences from DH-Pahang were screened using Hidden Markov models for pfam NBS-LRR signature domains (NB-ARC, TIR, RPW8 and LRR). A resultant species-specific HMM profile was then employed via a *hmmsearch* to identify target loci in *Musa acuminata* genotypes ssp. *burmannica* (var. Calcutta 4), ssp. *banksii* (Banksii), ssp. *zebrina* (Maia Oa), *Musa balbisiana* (PKW) and *Musa itinerans* (Yunnan). We identified 76, 70, 33, 60, 61 NBS-LRR type genes and 104, 34, 92, 39, 77 partial NBS genes, respectively for Calcutta 4, Banksii, Maia Oa, PKW and Yunnan. Using specific biotinylated RNA baits for target enrichment, a combined approach of R-gene sequence enrichment (RenSeq) and single-molecule real-time sequencing (SMRT RenSeq) is underway to clone multiple NLR genes in *Musa* genotypes. Full length NLR sequences will provide insight into the organization and evolution of R-genes in *Musa* and offer considerable application in crop improvement for disease resistance.

### Authors

**Amanda Cristina Araújo**

*University of Brasília*

**Tatiana D. Miranda Pinheiro**

*Universidade de Brasília*

**Erica C. S. Rego**

*Universidade de Brasília*

**Gabriel S. C. Alves**

*Universidade de Brasília*

**Fernando C A Fonseca**

*Universidade de Brasília*

**Jose Dijair Antonino-Souza Jr**

*University of Brasília*

**Robert N. G. Miller**

*University of Brasília*

**Find Similar**

<https://pag.confex.com/pag/xxvii/meetingapp.cgi/Paper/33332>

Page 1 of 2