

MICRORNAs DE PLANTAS SOB ESTRESSES TÍPICOS DA CAATINGA

Clebiano da Costa Sá*; Michely Correia Diniz**

*Mestre em Bioinformática pelo Instituto de Matemática e Estatística - Universidade de São Paulo (IME-USP).

** Docente associada de Genética, Biologia Evolutiva e Biotecnologia e Bioinformática da Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF Doutorado em Biotecnologia - RENORBIO pela Universidade Estadual do Ceará.

*Autor para correspondência e-mail: michely.diniz@univasf.edu.br

PALAVRAS-CHAVE

mirRNA Vegetal
Protegé
Semiárido

KEYWORDS

mirRNA Plants
Protegé
Semiarid

RESUMO

Em vegetais, respostas fisiológicas ao estresse estão relacionadas a mecanismos de regulação gênica, que envolve pequenas moléculas de RNA não codificante de proteína, conhecidas como microRNA (miRNA). Em meio ao grande volume de dados acerca dos miRNAs, sejam sequências, relações funcionais ou características, a utilização de ontologias têm se destacado como alternativa na organização e recuperação da informação, possibilitando a criação de novos conhecimentos a partir da análise integrada dos dados existentes. O objetivo deste trabalho foi montar uma rede integrativa de miRNAs de plantas sob estresses típicos da Caatinga, através de análises computacionais, realizando buscas nas principais bases de dados, e compreendendo as relações dos miRNAs com seus alvos e com o tipo de estresse. Foram encontradas nove (09) famílias de miRNAs comuns às três categorias de estresse estudadas: déficit hídrico, elevadas temperaturas e salinidade, sendo eles miR159, miR166, miR168, miR172, miR395, miR482, miR530, miR1446 e miR1447. Esse trabalho contribuiu ao apresentar o panorama de miRNA vegetais, com suas características, identificando e selecionando a ocorrência de miRNAs responsivos a apenas um tipo de estresse, enquanto outros estão relacionados a diferentes estresses; esses dados representam um ponto de partida para pesquisas com miRNA em espécies da Caatinga.

ABSTRACT

PLANTS MICRORNAs UNDER CAATINGA STRESS

In plants, physiological responses to stress are related to mechanisms of gene regulation, which involves small non-protein-coding RNA molecules known as microRNA (miRNA). The use of ontologies have been highlighted as an alternative in the organization and retrieval of information, enabling the creation of new knowledge from the integrated analysis of existing data. The aim of this work was to assemble an integrative network of plant miRNAs under typical Caatinga stresses, through computational analysis, searching the main databases, and understanding the relationships of miRNAs with their targets and with the type of stress. Nine (09) miRNA families common to the three stress categories were found - water deficit, high temperatures and salinity, being miR159, miR166, miR168, miR172, miR395, miR482, miR530, miR1446 and miR1447. This work contributed by presenting results of plant miRNA, with its characteristics, identifying and selecting the occurrence of miRNAs responsive to only one type of stress, while others are related to different stresses; these data represent a starting point for miRNA research in Caatinga species.

Recebido em: 06/10/2019

Aprovação final em: 15/12/2019

DOI: <https://doi.org/10.25061/2527-2675/ReBraM/2020.v23i1.751>

INTRODUÇÃO

O Bioma Caatinga é detentor de um grande número de espécies endêmicas e únicas, que devem ser consideradas como um patrimônio biológico de valor incalculável, contraditoriamente a sua riqueza, beleza e resiliência, apresenta um potencial econômico ainda pouco explorado e valorizado. Estas espécies apresentam características fisiológicas que refletem adaptações complexas e peculiares às condições ambientais únicas, com predominância de estresses como déficit hídrico, altas temperaturas e salinidade (TROVÃO et al., 2007).

É sabida a importância de se conhecer sobre a informação genética de qualquer organismo vivo. Muito além de conhecer “quem dá as ordens”, que no caso seria o DNA; uma vez que o mundo já vivenciou a explosão dos dados de sequenciamento, e agora investe esforços em ressequenciar e remontar os dados biológicos. Os cientistas estão priorizando os “executores” como proteínas, e principalmente os RNAs (ácidos ribonucleicos), que antes eram considerados apenas simples coadjuvantes ou intermediários no processo da informação biológica. Paradoxalmente, ou não, a molécula da vez é o RNA não-codificante.

Em vegetais, respostas fisiológicas ao estresse estão relacionadas a mecanismos de regulação gênica, que envolve pequenas moléculas de RNA não codificante de proteína, conhecidas como microRNA (miRNA). Por esse motivo, os miRNAs são intensamente estudados. Apresentando potencial para o desenvolvimento de variedades vegetais resistentes a diversos estresses (SANZ-CARBONELL et al., 2019)

Diante da conservação da função de algumas famílias de miRNAs em diversas espécies, enquanto outras podem apresentar perfis de expressão distintos entre espécies, ou mesmo dentro da espécie com genótipos de diferentes sensibilidade ao estresse, o estudo dos miRNAs vegetais, seus promotores e alvos, relacionados à estresses abióticos, além de auxiliar na melhor compreensão do funcionamento celular perante as variadas situações de estresse, pode trazer perspectivas para estudos evolutivos e aproveitamento do potencial de resistência das espécies vegetais da Caatinga, contribuindo assim, para a conservação deste patrimônio genético.

MiRNAs são moléculas pequenas, com cerca de 20-24 nucleotídeos (nt). Conhecidos por desempenharem papéis regulatórios importantes em diversos eucariotos, inclusive em plantas, envolvendo respostas a condições de estresse abiótico (ZHANG et al., 2013). Essas moléculas são complementares inversos a trechos de outros transcritos e muitas vezes podem inibir a expressão do gene alvo, num processo conhecido como silenciamento gênico (KIM et al., 2009).

Em pouco mais de 25 anos são conhecidos cerca de 38.589 miRNAs; para plantas, até a última atualização do banco de dados miRBase, (<http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl>) são registrados 6.942 anotações para miRNA de 72 espécies diferentes de plantas terrestres (AXTELL AND MAYERS, 2018).

Nos últimos anos tem sido demonstrado que miRNAs atuam em redes gênicas regulando processos fisiológicos essenciais em vegetais ao afetarem de forma direta ou indireta as concentrações de proteínas e hormônios envolvidos com o desenvolvimento da planta: durante a maturação do órgão floral, a morfogênese da folha, a iniciação da raiz e desenvolvimento vascular, além de desempenharem papéis fundamentais em respostas a estresses (WANG et al., 2019)

Durante o estresse abiótico sofrido pelos vegetais, tais como déficit hídrico, salinidade, injúrias e altas temperaturas, os miRNAs mediam o silenciamento gênico transitório em redes gênicas associadas com a adaptação e tolerância ao estresse, restabelecendo a homeostase celular, muitas vezes a preço do desenvolvimento e da taxa de crescimento da planta (SPANUDAKIS; JACKSON, 2014).

Os produtos maduros dos genes de miRNA biologicamente ativos definem as famílias de genes de miRNA. Isto, juntamente com a característica da estrutura em grampo de seu precursor imaturo (pré-miRNA) permite a detecção e anotação computacional dos genes de miRNA (ADAI et al., 2005)

Em meio ao grande volume de dados acerca dos miRNAs, sejam sequências, relações funcionais ou

características, a utilização de ontologias têm se destacado como alternativa na organização e recuperação da informação, possibilitando a criação de novos conhecimentos a partir da análise integrada dos dados existentes (ALMEIDA; BAX, 2003).

Ontologias são formas de representação das informações de um determinado domínio a partir da padronização de termos, fornecendo um vocabulário comum sobre um domínio, possibilitando seu maior entendimento e mais fácil comunicação entre especialista ou não. Em domínios biológicos são usadas como base para a interoperabilidade entre sistemas, e para busca, integração e troca de dados biológicos (CHANDRASEKARAN; BONCHEV, 2013; LAUXEN, 2012).

A montagem de ontologias trata-se de uma atividade dispendiosa, portanto são utilizados programas editores de ontologias, dentre os quais, Protégé é sugerido como mais adequado na montagem de ontologias para ncRNAs (LAUXEN, 2012).

Protégé é uma plataforma escrita em linguagem Java, de código aberto, com um conjunto de ferramentas que possibilitam a criação, visualização e manipulação de ontologias. Em sua interface gráfica é disponibilizado uma barra de menus e uma barra de ferramentas, além de apresentar cinco áreas de visualização (*views*) que funcionam como módulos de navegação e edição de classes, atributos, formulários, instâncias e pesquisas na base de conhecimento, propiciando a entrada de dados e a recuperação das informações (LAUXEN, 2012; STANFORD UNIVERSITY, 2019).

A Bioinformática continua a ser uma parte integrante de todos os métodos que objetivam estudar miRNAs. A modelagem por computador e os programas modernos tornaram possíveis experimentos *in silico*, proporcionando a possibilidade de trabalhar com uma ou muitas sequências para prever possíveis alvos de miRNA, visualizar modelos de grampos precursores, simular redes globais de miRNA reguladores e analisar o resultados de sequenciamento (PASHKOVSKIY; RYAZANSKY, 2013)

O objetivo deste trabalho foi montar uma rede integrativa de miRNAs vegetais sob estresses típicos da Caatinga, através de análises computacionais, realizando buscas nas principais bases de dados, e compreendendo as relações dos miRNAs com seus alvos e com o tipo de estresse.

MATERIAL E MÉTODOS

No banco de dados PASmiR¹ foram identificados os miRNAs relacionados ao déficit hídrico (*Drought*), a salinidade (*high salt*) e a altas temperaturas (*Heat*). Bem como, seus alvos e a família a qual estão classificados.

Os IDs (identificadores) foram listados em planilhas Excel e submetidos a ferramentas para eliminação de redundância. A partir desta lista, dois arquivos com extensão “.txt” foram criados com base nas regras de nomenclatura do banco de dados miRBase: um referente a sequências maduras, com o termo “mir” (*IDs_sequencias_maduras.txt*), e outro referente a sequências precursoras, com o termo “MIR” (*IDs_sequencias_precursoras.txt*).

Os bancos de miRNAs com sequências maduras e sequências precursoras, disponíveis em (<http://www.mirbase.org/>), foram baixados a partir do terminal do Ubuntu 13.10 com a linha de comando representada abaixo:

Download do banco de dados de sequências maduras:

```
$ wget ftp://mirbase.org/pub/mirbase/CURRENT/mature.fa.gz
```

Download do banco de dados de sequências precursoras:

```
$ wget ftp://mirbase.org/pub/mirbase/CURRENT/hairpin.fa.gz
```

Depois de baixar e extrair os arquivos referentes aos bancos de sequências maduras (*mature.fasta*) e de sequências precursoras (*hairpin.fasta*), uma linha de comandos escrita em linguagem de programação

¹Disponível em: <<https://omictools.com/pasmir-tool>>

Perl para filtragem de seqüências nucleotídicas a partir de uma lista de IDs especificada foi executada no terminal do Ubuntu 13.10 (SCHMIEDER, 2014):

Filtragem de seqüências maduras:

```
$ perl -ne 'if(/^>(\S+)/){$c=$i{$1}}$c?print:chomp;$i{$_}=1 if @ARGV' IDs_
sequencias_maduras.txt mature.fasta > sequencias_maduras.fasta
```

Filtragem de seqüências precursoras:

```
$ perl -ne 'if(/^>(\S+)/){$c=$i{$1}}$c?print:chomp;$i{$_}=1 if @ARGV' IDs_
sequencias_precursoras.txt hairpin.fasta > sequencias_precursoras.fasta
```

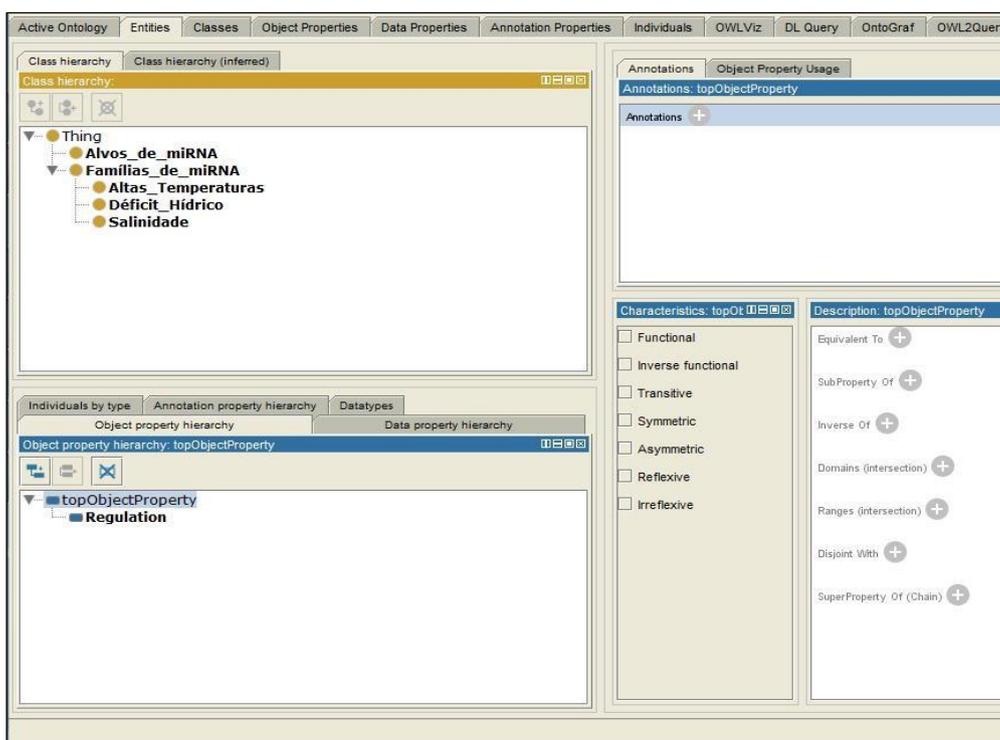
BUSCA POR FAMÍLIAS COMUNS A CAATINGA

A existência de registros de distribuição das espécies e de suas famílias para a Caatinga foi verificada mediante buscas na Lista de Espécies da Flora do Brasil².

ONTOLOGIA DA RELAÇÃO MI-RNA-ALVO

As relações entre famílias de miRNAs que regulam ao menos dois alvos distintos foram estruturadas na forma de ontologia utilizando o editor Protégé. Foram criadas cinco classes (Alvos_de_miRNA, Famílias_de_miRNA, Altas_Temperaturas, Déficit_Hídrico e Salinidade), seguindo a hierarquia apresentada na (Figura 1). Como objetos foram utilizados todos os miRNAs e alvos. Como propriedade do objeto utilizou-se o termo *Regulation* (regulação).

Figura 1 – Esquema das classes criadas no editor de ontologias Protégé.



Fonte: Elaborada pelos Autores.

²Disponível em : <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/ConsultaPublicaUC.do>>

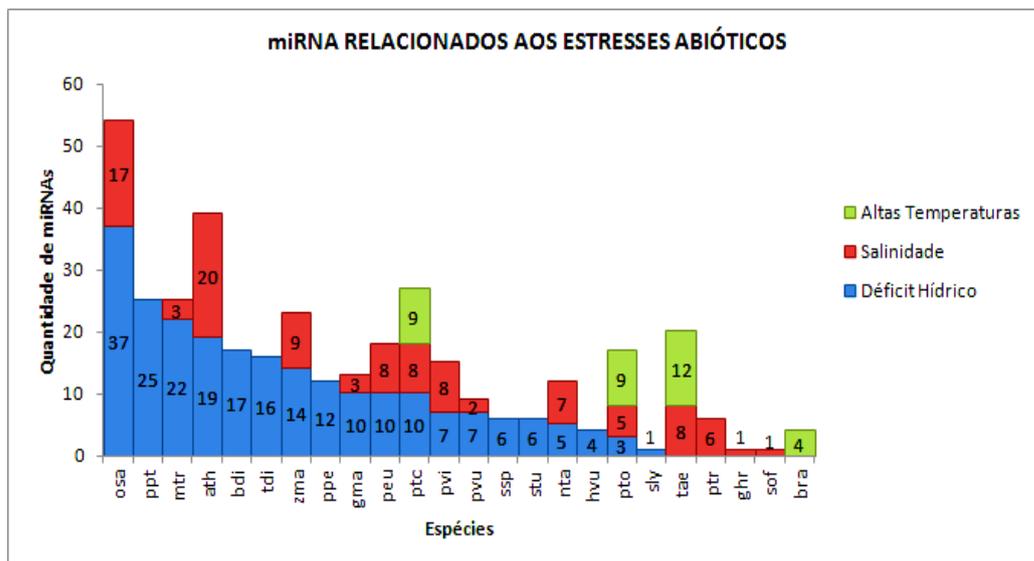
RESULTADOS E DISCUSSÃO

No banco de dados PASmiR foram identificadas 231, 106 e 34 entradas de miRNAs relacionados ao déficit hídrico, a salinidade e a altas temperaturas, respectivamente. Estas entradas correspondem a 138, 70 e 29 sequências únicas de miRNAs para os respectivos estresses, pertencentes a 121 famílias de miRNA.

Os miRNAs recuperados estão distribuídos em 24 espécies como mostrado na Figura 2, representadas pelas famílias Brassicaceae, Fabaceae, Funariaceae, Malvaceae, Poaceae, Rosaceae, Salicaceae e Solanaceae. As espécies *Oryza sativa* (osa) com 54 entradas (14,56%) e *Arabidopsis thaliana* (ath) com 39 (10,51%) são as mais representadas. Enquanto, *Populus trichocarpa* (ptc) com 27 (7,28%) e *Populus tomentosa* (pto) com 16 (4,31%) são as únicas espécies com registros para as três condições. A variação na quantidade de miRNAs entre espécies pode estar relacionada ao nível de estudos como sugerido por Taylor et al. (2014), que revelaram ainda, os táxons *Arabidopsis* e *Oryza* como os mais representados em estudos com miRNAs (Figura 2).

Dentre as espécies, *Oryza sativa*, *Saccharum officinarum* e *Nicotiana tabacum* são as únicas com distribuição para a Caatinga (BASEADO NA LISTA DE ESPÉCIES DA FLORA DO BRASIL, 2014), retratando a negligência em estudos com miRNAs de espécies deste bioma, que se torna mais evidente quando observada a ausência de registros para espécies frutíferas, de grande importância econômica, social e ecológica para o semiárido nordestino, a exemplo do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda) (SILVA et al., 1991), espécie símbolo de resistência às condições estressantes do semiárido, com alguns mecanismos ecofisiológicos que propiciam tal adaptação (LIMA-FILHO; SILVA, 1988).

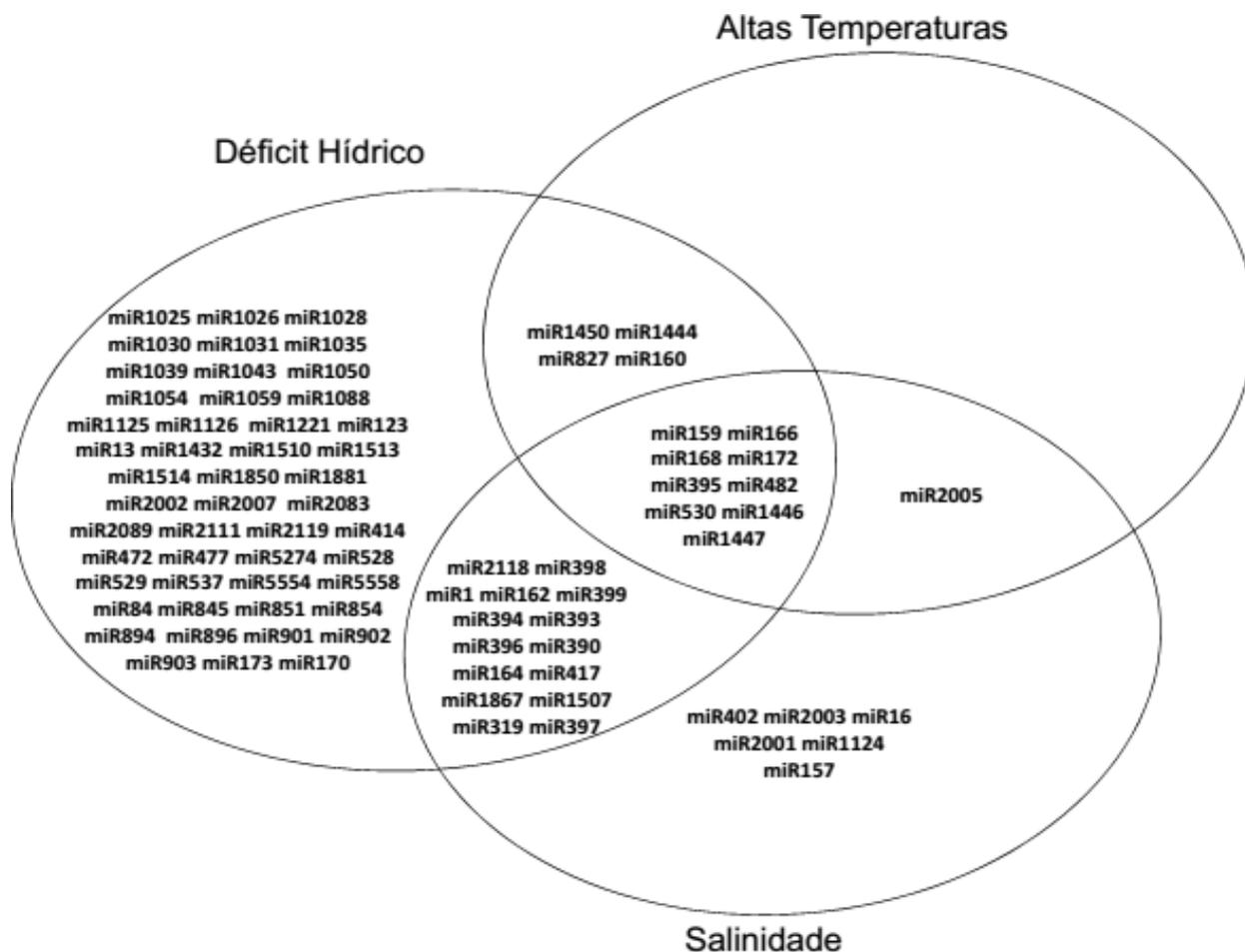
Figura 2 - Histograma representando a quantidade de entradas de miRNAs no banco de dados PASmiR relacionados aos estresses. Total de 371 entradas. *Arabidopsis thaliana* (ath); *Brachypodium distachyon* (bdi); *Glycine max* (gma); *Hordeum vulgare* (hvu); *Medicago truncatula* (mtr); *Nicotiana tabacum* (nta); *Oryza sativa* (osa); *Panicum virgatum* (pvi); *Phaseolus vulgaris* (pvu); *Physcomitrella patens* (ppt); *Populus euphratica* (peu); *Populus trichocarpa* (ptc); *Saccharum spp* (ssp); *Solanum lycopersicum* (sly); *Solanum tuberosum* (stu); *Triticum dicoccoides* (tdi); *Zea mays* (zma); *Prunus persica* (ppe); *Gossypium hirsutum* (ghr); *Populus tomentosa* (pto); *Populus tremula* (ptr); *Saccharum officinarum* (sof); *Triticum aestivum* (tae); *Brassica rapa* (bra).



Fonte: Elaborada pelos Autores.

Neste trabalho foram encontrados nove (09) famílias de miRNAs comuns às três categorias de estresse estudadas: déficit hídrico, elevadas temperaturas e salinidade, sendo eles miR159, miR166, miR168, miR172, miR395, miR482, miR530, miR1446 e miR1447 (Figura 3).

Figura 3 – Diagrama de Venn representando as famílias de miRNAs relacionadas aos estresses.



Fonte: Elaborada pelos Autores.

Jones-Rhoades e Bartel (2004) identificaram computacionalmente famílias de miRNA de plantas e seus alvos que induziam ao estresse. Dentre eles destacamos as famílias de miR159, miR168, miR172 e o miR395 que também foram caracterizadas em nosso estudo, que identificou seus genes alvos como sendo respectivamente fator de transcrição MYB, proteína argonauta 1, *APETALA 2*, ATP sulfúrilase.

Jones-Rhoades e Bartel (2004) relataram que a expressão do miR395, cujos genes alvos envolvem a assimilação de sulfato, é sensível à concentração de sulfato no meio de crescimento, demonstrando que a expressão do miRNA pode ser modulada pelos níveis de metabólitos externos. Os autores também relataram que plantas deficientes no miR172, que media a regulação do *APETALA 2* (gene envolvido no desenvolvimento floral), possuem padrões do órgão floral alterados.

Chen (2004) também concluiu que formação de flores primordiais requer um complexo trabalho de vários genes. Um destes genes é *APETALA2* (AP2), cujo mRNA contém um sítio de ligação para miR172;

a superexpressão de miR172 leva à substituição de tecidos geradores do perianto por tecidos somáticos.

Sendo os miRNAs altamente conservados, e considerando que algumas famílias de miRNAs têm suas funções conservadas em diversas espécies, os miRNAs estudados neste trabalho representam um ponto de partida para pesquisas em espécies da Caatinga. Seja na construção de chips *microarray* utilizando como sequências de referência; ou na identificação computacional de miRNAs a partir da análise de homologia; ou na identificação de novos miRNAs e/ou circuitos de regulação, já que algumas famílias de miRNAs podem apresentar perfis de expressão distintos entre espécies, ou mesmo dentro da espécie com genótipos de diferentes sensibilidades ao estresse. Portanto, trata-se de um campo de estudo promissor, ao vir a contribuir com estudos evolutivos e com a manipulação destas moléculas para futuras aplicações na produção agrícola (BARTEL, 2004; SPANUDAKIS; JACKSON, 2014).

Baseados nestes preceitos Lu et al. (2008) desenvolveram chips *microarray* com sondas complementares a todos os miRNAs disponíveis para *Arabidopsis thaliana*, que aplicados em células sob déficit hídrico, salinidade e baixas temperaturas apresentaram 14 miRNAs (miR156, miR159, miR165, miR167, miR168, miR169, miR171, miR172, miR319, miR393, miR394, miR396, miR397 e miR408) com perfis de expressão diferencial em resposta aos estresses. Enquanto, Han et al. (2014) identificaram novos 27 miRNAs com 92 potenciais genes alvos para *Phaseolus vulgaris* ao analisar a homologia entre pequenas sequências não anotadas e 1804 miRNAs únicos correspondentes a 37 espécies vegetais.

Ao analisar as informações adicionais fornecidas pelo PASmiR foram identificadas 93 (76,86%) famílias de miRNAs com alvos conhecidos. Das quais, 68 (73,12%) apresentam apenas um alvo relacionado, enquanto 25 (26,88%) apresentam ao menos dois alvos distintos (Figura 4).

Na Figura 4, visualiza-se que, ao analisar os alvos conhecidos, alguns são regulados apenas em um dos estresses: déficit hídrico (56,72%) ou salinidade (12,69%). Enquanto, o restante é regulado sob ao menos duas condições: déficit hídrico e salinidade (14,92%); déficit hídrico e altas temperaturas (4,48%); ou altas temperaturas e salinidade, ou mesmo sob as três condições (8,12%).

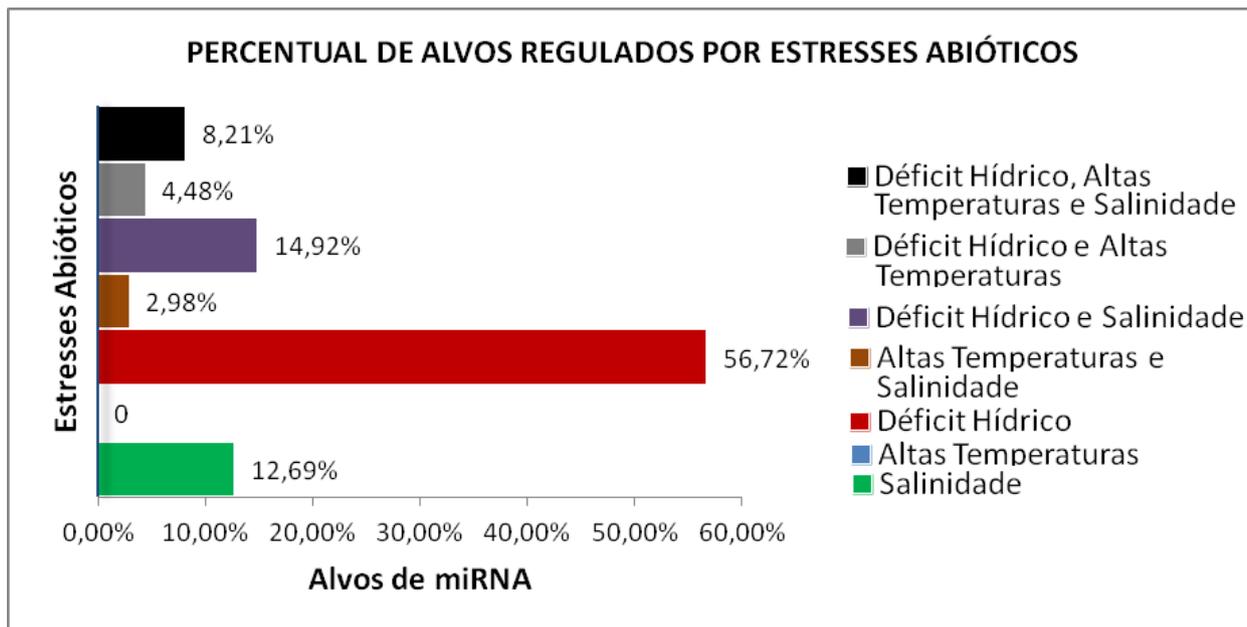
A regulação de determinados alvos em diferentes estresses evidencia que miRNAs atuam em circuitos, regulando mecanismos fisiológicos em resposta ao estresse. Portanto, é sugerido que alguns miRNAs apresentam papéis fundamentais em resposta a diferentes estresses. De acordo com Lu et al. (2008), os miRNAs miR167/168/171/396 apresentam expressão diferencial tanto sob déficit hídrico como sob salinidade. Esta estreita correlação deve ser considerada durante o desenvolvimento de variedades resistentes a determinados estresses (Figura 4).

A partir da filtragem de sequências por ID no banco de dados miRBase foram recuperadas 60 sequências maduras e 89 sequências precursoras. O reduzido número de sequências recuperadas pode estar relacionado a alterações no IDs de alguns miRNAs após descobertas de novas moléculas, ou talvez, a linha de comandos utilizada necessite de adaptações para os formatos de arquivos utilizados.

As ontologias biológicas têm sido muito utilizadas na tentativa de descrever todas as entidades dentro da realidade de uma área e todas as relações entre essas entidades. Uma ontologia compreende um conjunto de termos bem definidos com relações bem definidas. A própria estrutura reflete a representação atual do conhecimento biológico, bem como serve como um guia para a organização de novos dados (ASHBURNER, 2000).

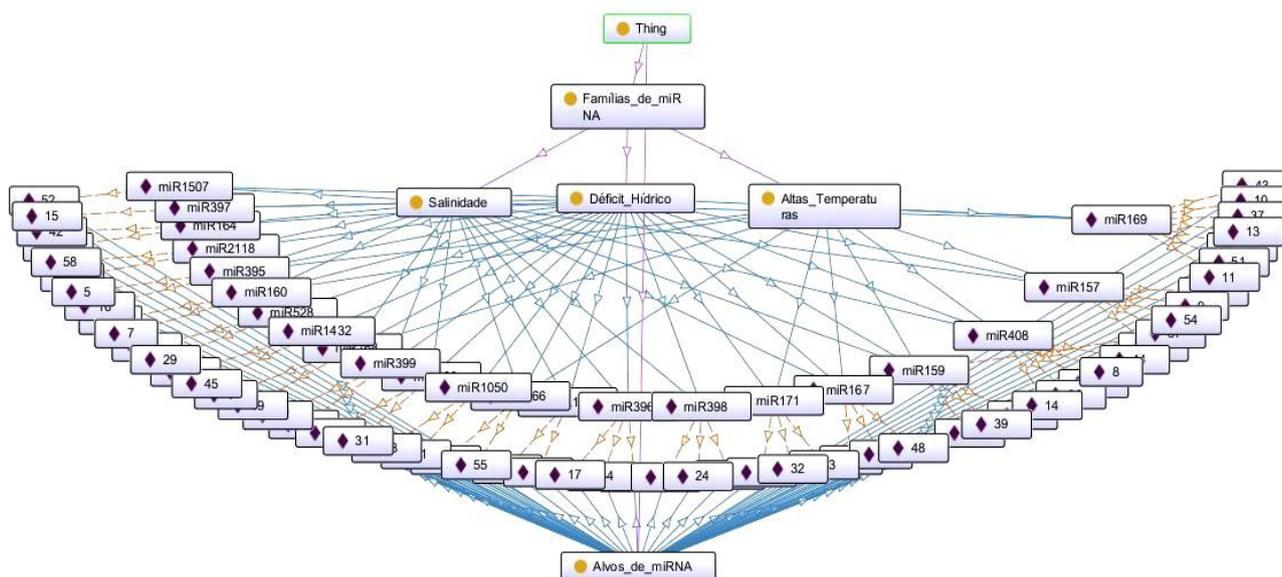
A integração dos dados de miRNAs identificados neste trabalho, seus alvos e suas conexões aos estresses estudados foram representados numa Ontologia como pode ser visualizado na Figura 5. Lauxen, 2012 apresentou uma proposta de representação de ncRNAs de células animais com ontologias, através da ferramenta Protégé.

Figura 4 - Representação dos percentuais de alvos regulados por miRNAs sob déficit hídrico, salinidade e/ou altas temperaturas. Total de 134 alvos de miRNAs.



Fonte: Elaborada pelos Autores.

Figura 5 – Imagem da ontologia gerada com o *software* Protégé com as relações miRNA-alvo disponíveis no ANEXO C. As setas em cor azul indicam a relação dos objetos com suas classes correspondentes. As setas em cor laranja indicam a relação entre objetos a partir da propriedade do objeto *Regulation*. As setas em cor vinho indicam as relações entre classes.



Fonte: Elaborada pelos Autores.

Lazarri et al. (2009) utilizando sequências genômicas completas de *Vitis vinifera* Pinot noir realizaram uma predição *in silico* de genes putativos de miRNA. Os dados foram integrados de acordo com as classes de ontologia gênica e vias metabólicas dos alvos.

O Consórcio de Ontologia Vegetal (COV)³ foi criado para atender a demanda de um conjunto de termos uniformes para descrever estruturas da planta e estágios de desenvolvimento. O COV é uma colaboração entre os bancos de dados de genomas de plantas e sistematas de plantas para criar, manter e usar vocabulários sistematizados para descrever fenótipos e padrões de genes de expressão de plantas. Já existem dados anotados de miRNA no Consórcio, sendo importante a abordagem integrativa desse trabalho, enriquecendo as discussões.

A rede de conexões apresentada pela ontologia da Figura 5 permitiu uma compreensão mais lúcida do modelo em estudo, estabelecendo-se como mais uma ferramenta para a transformação de dados em conhecimentos aplicáveis.

CONCLUSÃO

A disponibilidade de miRNAs para famílias de espécies da Caatinga e a alta conservação de algumas famílias de miRNAs em diferentes espécies possibilitam buscas por homólogos em espécies deste bioma.

A incipiência de estudos com miRNAs em espécies da Caatinga sob déficit hídrico, altas temperaturas e salinidade, bem como, a ausência de registros de miRNA para espécies consideradas símbolo de resistência às condições estressantes do semiárido nordestino, impulsionam para outros grandes desafios a fim de identificar novos miRNAs e/ou mecanismos de regulação gênica *in vivo* e *in vitro* vinculados a respostas fisiológicas de adaptação ao estresse.

Esse trabalho contribuiu ao apresentar o panorama de miRNA vegetais, com suas características, identificando e selecionando a ocorrência de miRNAs responsivos a apenas um tipo de estresse, enquanto outros estão relacionados a diferentes estresses; esses dados representam um ponto de partida para pesquisas em espécies da Caatinga, sendo de grande utilidade para intervenção, através da manipulação dessas moléculas, em características relacionadas à tolerância a seca, altas temperaturas e salinidade, além de possibilitar a manutenção do patrimônio genético e preservação dessas espécies. A representação das relações miRNAs-alvos na forma de ontologias poderá vir a dar suporte aos estudos que proponham identificar os circuitos de regulação destas moléculas.

REFERÊNCIAS

ADAI, A.; JOHNSON, C.; MLOTSHWA, S.; ARCHER-EVANS, S.; MANOCHA, V., VANCE, V. & SUNDARESAN, V. Computational prediction of miRNAs in *Arabidopsis thaliana*. **Genome research**, v. 15, n. 1, p. 78–91, jan. 2005.

ALMEIDA, M.; BAX, M. Uma visão geral sobre ontologias: pesquisa sobre definições, tipos, aplicações, métodos de avaliação e de construção. **Ciência da Informação, Brasília**, v. 32, n. 3, p. 7–20, 2003.

ASHBURNER, M.; BALL, C.A.; BLAKE, J.A.; BOTSTEIN, D.; BUTLER, H.; CHERRY, J.M.; DAVIS, A.P.; DOLINSKI, K.; DWIGHT, S.S.; EPPIG, J.T.; HARRIS, M.A.; HILL, D.P.; ISSEL-TARVER, L.; KASARSKIS, A.; LEWIS, S.; MATESE, J.C.; RICHARDSON, J.E.; RINGWALD, M.; RUBIN, G.M.; SHERLOCK, G. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genet.* 25, p. 25-29, 2000.

³Disponível em: <(http://www.plantontology.org/>

AXTELL, M. J.; MEYERS, B. C. Revisiting Criteria for Plant MicroRNA Annotation in the Era of Big Data. **The Plant Cell**.v. 30, n.2, p. 272-284. Feb 2018.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, v. 116, n.2, p. 281–297, 2004.

CHANDRASEKARAN, S.; BONCHEV, D. A Network View on Parkinson's Disease. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 7, n. 8, 1 abr. 2013.

CHEN, X. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science (New York, N.Y.)*, v. 303, n. 5666, p. 2022–5, 26 mar. 2004.

KIM, V.; N.HAN, J.; SIOMI, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 10, n. 2, p. 126–39, fev. 2009.

JONES-RHOADES, M. W.; BARTEL, D. P. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular cell*, v. 14, n. 6, p. 787–99, 18 jun. 2004.

LAUXEN, C. E. **Uma Representação Ontológica de Estruturas de ncRNA**. [s.l.] : UNIJUI, 2012.

LAZZARI, B.; CAPRERA, A.; CESTARO, A.; MERELLI, I.; DEL CORVO, M.; FONTANA, P.; STELLA, A. Ontology-oriented retrieval of putative microRNAs in *Vitis vinifera* via GrapeMiRNA: a web database of de novo predicted grape microRNAs. **BMC plant biology**, v. 9, p. 82, jan. 2009.

LIMA-FILHO, J.M.P; SILVA, C.M.M. Aspectos fisiológicos do umbuzeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.23, n.10, p 1091-1094, 1988.

LU, S.; SUN, Y.-H.; CHIANG, V. L. Stress-responsive microRNAs in *Populus*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, v. 55, n. 1, p. 131–51, jul. 2008.

PASHKOVSKIY, P. P.; RYAZANSKY, S. S. Biogenesis, evolution, and functions of plant microRNAs. *Biochemistry. Biokhimiia*, v. 78, n. 6, p. 627–37, jun. 2013.

SANZ-CARBONELL, A.; MARQUES, M.C.; BUSTAMANTE, A.; FARES, M. A.; RODRIGO, G., GOMEZ, G. Inferring the regulatory network of the miRNA-mediated response to biotic and abiotic stress in melon. **BMC Plant Biology**, v. 78 n. 19,p. 1471-2229. 2019.

SCHMIEDER, R. **Perl one liner to extract sequences by their ID from a FASTA file**. Disponível em: <http://edwards.sdsu.edu/labsite/index.php/robert/381-perl-one-liner-to-extract-sequences-by-their-identifier-from-a-fasta-file>>. Acesso em: 18 fev 2014.

SILVA, A. Q.; SILVA, H.; SILVA, H.M.M.; CARDOSO, E.A. Estado nutricional de plantas de umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.) e absorção de NPK pelos frutos por ocasião da colheita. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Cruz das Almas, v. 13, n. 4. p. 259-263, 1991.

SPANUDAKIS, E.; JACKSON, S. The role of microRNAs in the control of flowering time. **Journal of**

experimental botany, v. 65, n. 2, p. 365–80, mar. 2014.

STANFORD UNIVERSITY. **Protégé WebSite**. Disponível em: <<http://protege.stanford.edu/>>. Acesso em: 01 Set 2019.

TROVÃO, D.M. B. M.; FERNANDES, P. D.; ANDRADE, L. A.; NETO, J. D. Variações sazonais de aspectos fisiológicos de espécies da caatinga. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 11, n. 3, p. 307-311, 2007.

WANG, J.; MEI, J.; REN, G. Plant microRNAs: Biogenesis, Homeostasis, and Degradation. **Frontiers in Plant Science**, v 27, n. 10. 2019.

ZHANG, S.; YUE, Y.; SHENG, L.; WU, Y.; FAN, G.; LI, A.; HU, X.; SHANGGAN, M.; WEI, C. PASmiR: a literature-curated database for miRNA molecular regulation in plant response to abiotic stress. **BMC plant biology**, v. 13, n. 1, p. 33, jan. 2013.