

IDENTIFICAÇÃO DE microRNAs ENVOLVIDOS NO
DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE *GLYCINE MAX* (L.)
MERRILL

PAULA MACHADO DE ARAÚJO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO

Campos dos Goytacazes, RJ

Fevereiro de 2020

IDENTIFICAÇÃO DE microRNAs ENVOLVIDOS NO
DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE *GLYCINE MAX* (L.)
MERRILL

PAULA MACHADO DE ARAÚJO

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Mestre em Biociências e
Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Clícia Grativol Gaspar de Matos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO

Campos dos Goytacazes, RJ

Fevereiro de 2020

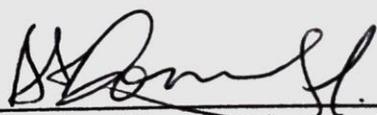
IDENTIFICAÇÃO DE microRNAs ENVOLVIDOS NO
DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE *GLYCINE MAX* (L.)
MERRILL

PAULA MACHADO DE ARAÚJO

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Mestre em Biociências e
Biotecnologia.

Aprovada em 18 de fevereiro de 2020.

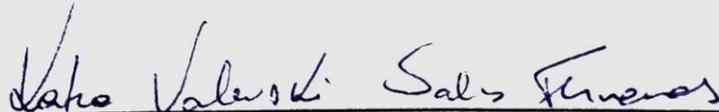
Comissão Examinadora:



Douglas Silva Domingues (DSc., Biotecnologia) – UNESP



Claudete Santa-Catarina (DSc., Biotecnologia) – UENF



Kátia Valevski Sales Fernandes (PhD, Bioquímica e Biologia Molecular de
Plantas) – UENF



Clícia Grativol Gaspar de Matos (DSc., Química Biológica) – UENF
(Orientadora)

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

A663

Araújo, Paula Machado de.

Identificação de microRNAs envolvidos no desenvolvimento de sementes de *Glycine max* (L.) Merrill. / Paula Machado de Araújo. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2020.

72 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2020.

Orientadora: Clícia Grativol Gaspar.

1. microRNAs. 2. embriogênese de sementes. 3. perfil de expressão. 4. soja. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer grandemente a todos (as) aqueles (as) que cooperaram para que esta dissertação de mestrado se concretizasse, especialmente:

À minha orientadora Profa. Dra. Clícia Grativol Gaspar de Matos, por todos os ensinamentos e conhecimentos compartilhados desde minha iniciação científica, e por toda paciência e dedicação em me orientar. Sou grata por fazer parte de seu grupo de pesquisa e por todas as oportunidades de aprendizado que tive, a partir do momento em que entrei no laboratório. Sem dúvidas, tudo que aprendi foi essencial para meu crescimento profissional e pessoal.

A todos os amigos do Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (Fernanda, Juliana, Walaci, Leandro, Sara, Maria Luíza, Deise, Cida, Jacymara, Jaqueline e Sara Nállia) pela amizade de vocês, por todo auxílio, pelos momentos compartilhados, e por poder conviver com pessoas tão maravilhosas.

Aos professores Dr^a Claudete Santa-Catarina, Dr. Douglas Silva Domingues e Dr^a Kátia Valevski Sales Fernandes por aceitarem compor a banca examinadora e por todas as contribuições.

À Dr^a Flávia Thiebaut pela prestatividade em aceitar revisar a dissertação.

Ao amigo Fabrício Machado por todo auxílio oferecido com as ferramentas de bioinformática desde o início do mestrado, o que foi fundamental para o desenvolvimento desse trabalho.

Às amigas Sara Sangi e Fernanda Coelho pelo auxílio durante os procedimentos experimentais.

Ao Dr. Blake Meyers e sua equipe pela colaboração na construção do banco de dados.

À minha amiga Marcela Cordeiro, que além de ser minha *roommate*, é como uma irmã para mim.

Ao meu estimado Elias Ribeiro, por todo apoio e auxílio oferecido durante a confecção da dissertação.

Aos meus pais, Luza Machado e Paulo Araújo, por acreditarem em mim, por me apoiarem e por criarem oportunidades para que eu chegasse até aqui.

A todos os professores da pós-graduação que compartilharam seus conhecimentos valiosos durante as disciplinas.

A todos os funcionários e servidores da UENF que direta ou indiretamente contribuíram com minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001 - pela concessão da bolsa de mestrado.

Muitíssimo obrigada a todos!

“Quase todos os aspectos da vida são organizados em nível molecular e, se não entendermos as moléculas, nossa compreensão da própria vida ficará muito incompleta.”

(Francis Crick – biólogo molecular, biofísico e neurocientista britânico)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ranking dos países produtores de soja no ano de 2017 (Adaptado de FAOSTAT, 2017).....	2
Figura 2: Estádios da embriogênese da semente da eudicotiledônea <i>Brassica napus</i>	5
Figura 3: Classificação sumarizada dos RNAs não codificadores.....	7
Figura 4: Biogênese dos microRNAs em plantas (Adaptado de ARMENTA-MEDINA; GILLMOR, 2019).	13
Figura 5: Esquema demonstrando as etapas metodológicas empregadas para a análise de miRNAs conhecidos (I) e novos (II) envolvidos na regulação da embriogênese e maturação de sementes de soja.....	18
Figura 6: Imagem ilustrativa da página correspondente ao banco de dados construído para a análise de phasiRNAs.	21
Figura 7: Distribuição de tamanho das sequências de sRNAs após a filtragem dos <i>reads</i> quanto ao comprimento (18-28 nt), considerando os <i>reads</i> totais e <i>reads</i> não redundantes, nos quatro estádios da embriogênese (A), e separadamente nos estádios globular (B), coração (C), cotiledonar (D) e maduro (E).	25
Figura 8: Diagrama de Venn demonstrando a distribuição dos 66 miRNAs conhecidos, expressos nos estádios globular (GL), coração (CR), cotiledonar (CT) e maduro (MT).....	28
Figura 9: <i>Heatmap</i> gerado a partir dos valores de expressão normalizados dos 49 miRNAs identificados no estádio globular.	31
Figura 10: <i>Heatmap</i> gerado a partir dos valores de expressão normalizados dos 50 miRNAs identificados no estádio de coração.	32
Figura 11: <i>Heatmap</i> gerado a partir dos valores de expressão normalizados dos 61 miRNAs identificados no estádio cotiledonar.	33
Figura 12: <i>Heatmap</i> gerado a partir dos valores de expressão normalizados dos 56 miRNAs identificados no estádio maduro.....	34
Figura 13: miRNAs conhecidos mais expressos durante os quatro estádios da embriogênese em <i>G. max</i> e seus respectivos alvos.	35
Figura 14: Resultado da busca por phasiRNAs gerados pelo miR2118.....	36

Figura 15: Proporção de miRNAs novos de 21 e 22 nt específicos dos estádios globular (GL), coração (CR), cotiledonar (CT) e maduro (MT).	37
Figura 16: Porcentagem de A, U, C e G na primeira posição das sequências de candidatos a miRNAs específicos dos estádios globular (GL), coração (CR), cotiledonar (CT) e maduro (MT).	38
Figura 17: Diagrama de Venn demonstrando a distribuição dos 228 miRNAs novos presentes nos estádios globular (GL), coração (CR), cotiledonar (CT) e maduro (MT).....	39
Figura 18: <i>Heatmap</i> gerado a partir dos valores de expressão normalizados dos miRNAs novos com expressão acima de 15 RPM.	40
Figura 19: Gráfico gerado a partir dos valores de intensidade média de fluorescência das amostras DFHBI + Sonda; DFHBI + Água; e Sonda + Água (A). Representação da sonda FASTmiR (<i>modSpinach</i>) ativada, ao se ligar ao fluoróforo DFHBI, representado em verde (B) (Adaptado de Huang et al. (2017)).....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de *reads* antes e após a filtragem das bibliotecas de sRNAs de sementes com embriões nos estádios globular, coração, cotiledonar e maduro em soja..... 26

Tabela 2: Listagem dos 39 miRNAs conhecidos comuns a todos os estádios. 29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGO	Argonauta
ARF	<i>Auxin Response Factor</i>
BLASTn	<i>Basic Local Alignment Search Tool – Nucleotide</i>
casiRNA	<i>cis-acting siRNA</i>
CSD	<i>Copper/Zinc Superoxide Dismutase</i>
CUC	<i>Cup-Shaped Cotyledon</i>
DCL	<i>Dicer-like</i>
DFHBI	3,5-difluoro-4-hidroxibenzilideno imidazolinona
dsRNA	<i>double-stranded RNA</i>
easiRNA	<i>epigenetically activated siRNA</i>
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
hc-siRNA	<i>heterochromatic siRNA</i>
HD-ZIP III	<i>Homeodomain-Leucine Zipper III</i>
HUA1	<i>Hua-Enhancer 1</i>
HYL1	<i>Hyponastic Leaves 1</i>
lncRNA	<i>long non-coding RNA</i>
miRNA	microRNA
miRNA*	microRNA estrela
mRNA	RNA mensageiro
nat-siRNA	<i>natural antisense transcript-derived siRNA</i>
NBS-LRR	<i>Nucleotide binding site–leucine-rich repeat</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ncRNA	<i>non-coding RNA</i>
nt	Nucleotídeos
phasRNA	<i>phased, secondary, small interfering RNA</i>
piRNA	<i>PIWI-interacting RNA</i>
Pol. II	RNA polimerase II
pré-miRNA	MicroRNA precursor
pri-miRNA	MicroRNA primário
RdDM	<i>RNA-directed DNA Methylation – RdDM</i>
RDR	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
RISC	<i>RNA-Induced Silencing Complex</i>

RNA	Ácido ribonucleico
RPM	<i>Reads per 1 million</i>
rRNA	RNA ribossomal
SE	SERRATA
siRNA	Pequeno RNA de interferência
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i>
snoRNP	<i>small nucleolar ribonucleoprotein</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
snRNP	<i>small nuclear ribonucleoprotein</i>
SPL	<i>Squamosa Promoter-Binding Protein-Like</i>
SRA	<i>Sequence Read Archive</i>
sRNA	Pequeno RNA
ssRNA	<i>single-stranded RNA</i>
TAS3	<i>Trans-Acting siRNA3</i>
tasiRNA	<i>trans-acting siRNA</i>
tRNA	RNA transportador
tyRNA	<i>tiny RNA</i>
UEA	<i>University of East Anglia</i>

RESUMO

A semente é órgão responsável pela perpetuação e dispersão de espécies de espermatófitas. Além disso, são ricas fontes de nutrientes e constituem a base da alimentação em diversos países. A agricultura depende em grande parte da viabilidade das sementes e, por isso, é fundamental que o desenvolvimento das mesmas ocorra corretamente. Muitos mecanismos moleculares regulam a embriogênese de sementes, sendo que os mais conhecidos são guiados por hormônios. Entretanto, estudos mostram que RNAs não codificadores (ncRNAs), como microRNAs (miRNAs), podem modular o processo de embriogênese, e que a inibição dessas moléculas regulatórias pode ser letal para o embrião e comprometer a formação da semente. Os miRNAs podem regular a expressão gênica tanto em nível transcricional, quanto pós-transcricional. Em plantas, já foi demonstrada a ação desses ncRNAs nos mais variados processos biológicos, como na formação de meristemas, separação de órgãos e transição da fase vegetativa para a fase de floração. Neste trabalho, buscamos identificar miRNAs conhecidos e novos envolvidos com o desenvolvimento de sementes de soja (*Glycine max*), uma leguminosa de grande importância nutricional e econômica. A metodologia envolveu o uso de diferentes ferramentas de bioinformática para filtragem das bibliotecas de pequenos RNAs, identificação de miRNAs conhecidos e novos, análise do perfil de expressão, análise de phasiRNAs gerados por miRNAs conhecidos, e predição dos possíveis alvos dos miRNAs. Também foi testada a viabilidade de utilização da técnica FASTmiR para detectar os níveis de miRNAs experimentalmente. Os resultados mostraram 66 miRNAs conhecidos expressos durante os diferentes estádios da embriogênese de sementes de soja. Desses miRNAs, 39 foram comuns a todos os estádios. A análise dos perfis de expressão dos miRNAs mostrou miRNAs altamente expressos em todos os estádios, como miR482, miR1507, miR1510, miR166, miR398, miR390, miR159 e miR2118. A busca por phasiRNAs desencadeados por miRNAs revelou que o miR2118 de 22 nt de comprimento é um precursor de phasiRNAs. Foram identificados 228 potenciais miRNAs novos, sendo que a maior parte desses miRNAs apresentou expressão estágio-específica. A predição de possíveis alvos dos miRNAs exibiu genes que desempenham

papeis importantes durante a formação de sementes. Os miRNAs novos apresentaram maior proporção de miRNAs de 22 nt, com maior porcentagem de sequências iniciando com uracila na extremidade 5'. A técnica FASTmiR demonstrou-se uma potencial alternativa para a identificação de miRNAs experimentalmente. Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para um maior entendimento de como os miRNAs modulam a embriogênese em sementes de soja, e colaboram para uma visão mais ampla de como ocorre a rede de regulação de um processo tão importante no ciclo de vida das plantas.

Palavras-chave: microRNAs; embriogênese de sementes; perfil de expressão; soja.

ABSTRACT

The seed is responsible for the perpetuation and dispersion of spermatophyte species. In addition, they are rich sources of nutrients and form the basis of food in several countries. Agriculture depends on the viability of seeds and, therefore, it is essential that their development occurs correctly. Many molecular mechanisms regulate the embryogenesis of seeds, the most well-known of them being those mediated by hormones. However, studies show that non-coding RNAs (ncRNAs), such as microRNAs (miRNAs), can modulate the process of embryogenesis, and that inhibition can be lethal to the embryo and compromise seed formation. miRNAs can regulate gene expression at both the transcriptional and post-transcriptional levels. In plants, the action of these ncRNAs in various biological processes has already been demonstrated, such as in the formation of meristems, organ separation and transition from the vegetative phase to the flowering phase. In this work, we seek to identify known and new miRNAs involved in the development of soybean seeds (*Glycine max*), a legume of great nutritional and economic importance. The methodology used different bioinformatic tools for filtering the libraries of small RNAs, identification of known and new miRNAs, analysis of the expression profile, analysis of phasiRNAs generated by known miRNAs, and prediction of putative miRNA targets. The feasibility of using the FASTmiR technique to detect miRNA levels was also tested experimentally. The results showed 66 known miRNAs expressed during the different stages of soybean embryogenesis. Of these miRNAs, 39 were common to all stages. Analysis of the expression profiles of miRNAs showed miRNAs with high expression in all stages, such as miR482, miR1507, miR1510, miR166, miR398, miR390, miR159 and miR2118. The search for phasiRNAs triggered by miRNAs revealed that the 22 nt long miR2118 is a precursor to phasiRNAs. A number of 228 potential new miRNAs were identified, and most of these miRNAs showed stage-specific expression. Prediction of putative miRNA targets exhibited genes that play important roles during seed formation. The new miRNAs showed a higher proportion of 22 nt miRNAs, with a higher percentage of sequences starting with uracil at the 5' end. The FASTmiR technique demonstrated a potential alternative for the identification of miRNAs experimentally. The results obtained in this work

contribute to a better understanding of how miRNAs modulate embryogenesis in soybean seeds, and contribute to a broader view of how the regulation network of such an important process in the life cycle of plants occurs.

Keywords: microRNAs; seed embryogenesis; expression profile; soybean.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Aspectos gerais sobre a cultura de soja.....	1
1.2. Desenvolvimento de sementes	3
1.3. Histórico e características dos RNAs não codificadores	5
1.3.1. MicroRNAs em plantas	11
1.3.1.1. Regulação da embriogênese de sementes mediada por miRNAs	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Objetivo geral	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. METODOLOGIA	17
3.1. Obtenção das bibliotecas de pequenos RNAs e filtragem dos arquivos	17
3.2. Identificação de miRNAs canônicos e avaliação dos níveis de expressão em cada estágio de desenvolvimento.....	19
3.3. Identificação de miRNAs novos e análise dos níveis de expressão	19
3.4. Diagramas de Venn.....	20
3.5. Identificação de alvos dos miRNAs	20
3.6. Análise de phasiRNAs gerados por miRNAs conhecidos	21
3.7. Aplicação da técnica FASTmiR	22
4. RESULTADOS	23
4.1. Análise das bibliotecas de pequenos RNAs	23
4.2. Identificação de miRNAs conhecidos e análise do perfil de expressão...	27
4.3. Análise de phasiRNAs.....	36
4.4. Identificação de miRNAs novos e análise do perfil de expressão	37
4.5. Identificação dos alvos dos miRNAs novos.....	41
4.6. Teste da técnica FASTmiR.....	41
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÃO	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
APÊNDICE	60

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais sobre a cultura de soja

A espécie *Glycine max* (L.) Merrill, conhecida popularmente como soja, é uma eudicotiledônea pertencente à família Fabaceae e subfamília Papilionoideae. Historicamente, essa leguminosa é reconhecida como um dos alimentos mais importantes para os seres humanos (HYMOWITZ, 2008). O local de origem da soja ainda não é completamente elucidado. No entanto, os indícios demonstram que essa espécie foi originada na Ásia, mais precisamente, na China Antiga (HYMOWITZ; NEWELL, 1981). Considerada uma das maiores fontes alimentares por quase 5.000 anos, a soja é classificada como um dos cinco grãos sagrados da civilização chinesa, juntamente com o arroz, o trigo, a cevada e o milho (CÂMARA, 1998; RIAZ, 2005).

A domesticação da soja se iniciou no século XI a.C. na China, a partir da espécie selvagem *Glycine soja* (HYMOWITZ, 1970). Devido a pouca disponibilidade de dados moleculares e arqueológicos, a origem do processo de domesticação permanece obscura ao longo dos anos. Entretanto, o sequenciamento do genoma de plantas selvagens e cultivadas de soja, além dos novos achados arqueológicos, permitiu uma visão mais clara desse processo. Diante disso, estudos recentes têm evidenciado que o local mais provável de domesticação da soja é o Vale Huang-Huai, na China Central (HAN et al., 2016; SEDIVY; WU; HANZAWA, 2017). Ademais, tem sido corroborada a hipótese de que, entre a transição de *G. soja* para *G. max*, houve a espécie intermediária *G. gracilis*, indicando que a especiação para a soja ocorreu como um processo gradual (KIM et al., 2010; SEDIVY; WU; HANZAWA, 2017).

Diante da dificuldade de intercâmbio com os países ocidentais, a soja se manteve restrita ao Oriente por muitos anos. Somente no final do século XV e início do século XVI, a partir da chegada dos primeiros navios europeus, houve a disseminação para o Ocidente. Na América, foi relatada pela primeira vez no ano de 1804, no estado da Pensilvânia – EUA, onde foi destacada sua importância como planta forrageira e produtora de grãos (PEIXOTO et al.,

2006). No Brasil, a introdução da soja ocorreu no ano de 1882, no estado da Bahia, por Gustavo D'utra. Tentativas e estudos foram feitos em outros estados e, aos poucos, a espécie se estabeleceu no país. Uma expansão significativa da cultura ocorreu na década de 1970, e a produtividade média aumentou através dos anos (BONATO; BONATO, 1987). Atualmente, o Brasil é considerado o segundo maior produtor de soja no mundo, estando atrás apenas dos Estados Unidos (Figura 1). A soja também é a segunda maior *commodity* produzida no Brasil, depois da cana-de-açúcar (FAOSTAT, 2017).

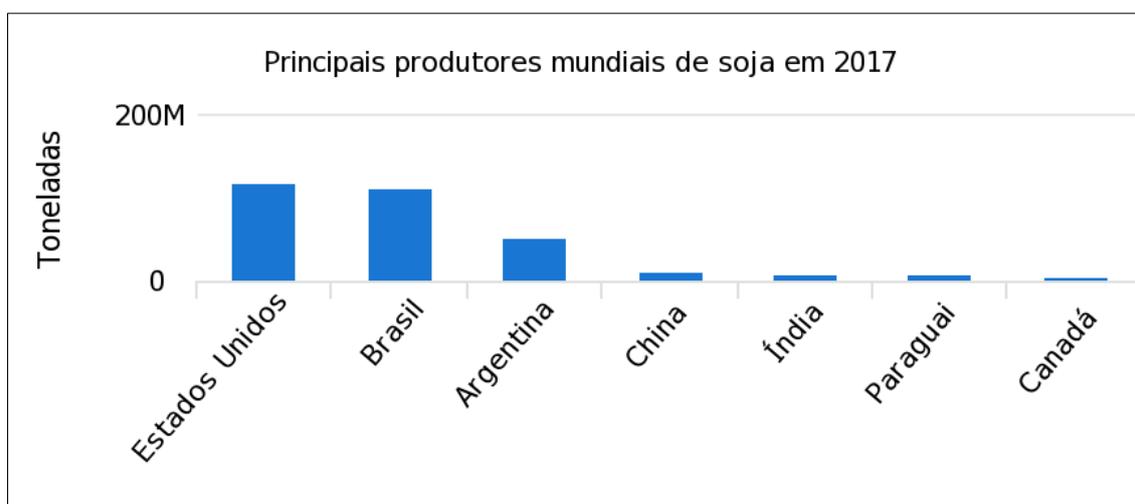


Figura 1: Ranking dos países produtores de soja no ano de 2017 (Adaptado de FAOSTAT, 2017).

Contendo cerca de 38–44% de proteína e 18–23% de óleo, além de carboidratos, fibras, vitaminas e minerais, a soja possui grande importância nutricional, tanto para humanos, quanto para animais (HYMOWITZ; NEWELL, 1981; RIAZ, 2005). Vale ainda ressaltar a relevância dessa leguminosa para a agricultura. Em razão da capacidade de formar nódulos radiculares através da simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, a soja é utilizada na adubação verde e na rotação de culturas, fornecendo nitrogênio para outros cultivos e reduzindo a necessidade da aplicação de fertilizantes (ESPINDOLA; GUERRA; ALMEIDA, 2005).

A soja foi a primeira espécie da família Fabaceae a ter o genoma sequenciado, possuindo um total de 20 cromossomos e cerca de 1115 megabases (Mb) (SCHMUTZ et al., 2010). A publicação do genoma em 2010

forneceu um conhecimento valioso, que contribuiu para o desenvolvimento de novas técnicas visando o incremento desta cultura. Ademais, a soja também é considerada uma espécie modelo para estudos em leguminosas, o que a torna um bom alvo para investigações em áreas como genética e biologia molecular (FERGUSON; GRESSHOFF, 2009).

1.2. Desenvolvimento de sementes

Dentre mais de 370 mil espécies descritas no reino vegetal, aproximadamente, 290 mil possuem sementes como propágulos (CHRISTENHUSZ; BYNG, 2016). É através das sementes que as espermatófitas, isto é, plantas com sementes (Gimnospermas e Angiospermas), são dispersas, contribuindo com o sucesso reprodutivo das plantas e garantindo a perpetuação das espécies (BEWLEY et al., 2013; TAIZ et al., 2015).

A formação da semente envolve diversos estádios e é influenciada por diferentes fatores, dentre eles, a fertilidade da planta. O processo de reprodução tem início com a transição da fase vegetativa para a reprodutiva, quando há alteração na atividade das células do meristema apical caulinar. Após o desenvolvimento floral, com a formação do grão de pólen e do saco embrionário, as plantas estão aptas à polinização (MARCOS-FILHO, 2005). Esse processo se inicia com a liberação do grão de pólen pela antera, o qual entra em contato com o estigma. O grão de pólen absorve o líquido exsudado pelo estigma e germina, formando o tubo polínico, que cresce no interior do estilete até alcançar o saco embrionário. O tubo polínico então penetra o saco embrionário por meio da micrópila, liberando duas células espermáticas. Uma das células espermáticas se funde à oosfera, dando origem ao zigoto. A segunda célula espermática se une à célula central, formando uma célula triploide, que origina o endosperma primário. O zigoto diploide passa por sucessivas divisões celulares, dando início à embriogênese, processo pelo qual uma célula única dá origem a uma entidade multicelular com uma organização característica (Figura 2). A partir do zigoto, ocorrem divisões celulares, levando à formação do suspensor e o embrião. O suspensor tem a função de empurrar o embrião em desenvolvimento para o centro do óvulo maduro, auxiliando na

transferência de nutrientes. O embrião propriamente dito passa por uma série bem coordenada de divisões, a fim de formar o embrião globular, o qual passa a estabelecer o plano corporal embrionário. Na semente contendo o embrião no estágio globular, o endosperma se encontra em divisão e o sistema vascular iniciando o seu desenvolvimento. No estágio de coração, o endosperma da semente é total ou parcialmente consumido para nutrir o embrião, e os cotilédones começam a se diferenciar, ocorrendo o estabelecimento da simetria bilateral, no caso das eudicotiledôneas. Na fase chamada torpedo, o eixo embrionário se alonga e os cotilédones estão em desenvolvimento. O embrião maduro é caracterizado pela presença dos cotilédones já desenvolvidos e do eixo embrionário, e a semente se encontra envolta por um fino revestimento, chamado de testa ou tegumento. Em espécies de eudicotiledôneas, como a soja, o embrião é formado por dois cotilédones e um eixo embrionário, enquanto as monocotiledôneas possuem um cotilédone e um eixo embrionário (POPINIGIS, 1985; BEWLEY et al., 2013; VENGLAT et al., 2014; TAIZ et al., 2015).

O eixo, também chamado de região hipocótilo-radicular do embrião, é constituído pelos meristemas da parte aérea e da raiz, e é responsável por originar a planta madura (GOLDBERG; DE PAIVA; YADEGARI, 1994). Ao fim da maturação da semente, o metabolismo é reduzido drasticamente, o embrião e a semente perdem água, e o crescimento é interrompido. Tal repouso fisiológico pode variar conforme a espécie e condições ambientais, e é encerrado pelo processo germinativo (MARCOS-FILHO, 2005; TAIZ et al., 2015). A germinação se inicia a partir da embebição de água, e é caracterizada pela retomada do metabolismo e do crescimento, assim como pelo recomeço da transcrição do genoma. O fim da germinação é marcado pela emergência da radícula e rompimento do tegumento (JANN; AMEN, 1980; BEWLEY et al., 2013; TAIZ et al., 2015).

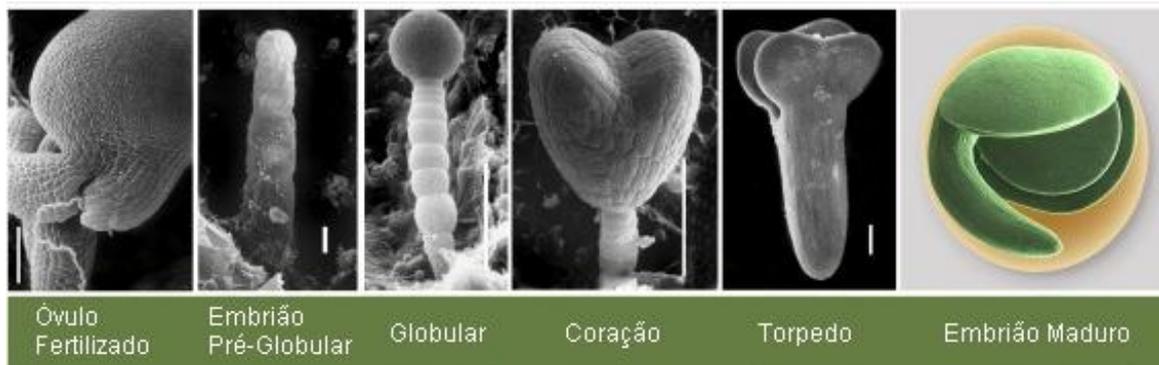


Figura 2: Estádios da embriogênese da semente da eudicotiledônea *Brassica napus*. São demonstrados os estádios: óvulo fertilizado, embrião pré-globular, embrião globular, embrião na fase de coração, torpedo e embrião maduro no interior da semente, respectivamente. Barra = 10 μ m para embrião pré-globular; 100 μ m para os outros estádios embrionários (Adaptado de VENGLAT et al., 2014).

O processo de embriogênese de sementes possui diferentes mecanismos de regulação. Entre os mais conhecidos estão os processos mediados por auxinas, hormônio essencial para a evolução do embrião. A auxina atua principalmente na iniciação dos cotilédones, propiciando a formação do embrião com simetria bilateral durante a fase de transição globular-coração (GOLDBERG; DE PAIVA; YADEGARI, 1994). Porém, além dos mecanismos mais conhecidos, existem outras moléculas capazes de atuar em diversos estádios do desenvolvimento de sementes, desde a fertilização até a pós-germinação. Dentre essas moléculas, os RNAs não codificadores, como os microRNAs, desempenham papel crucial, por serem capazes de regular genes-alvo fundamentais para o desenvolvimento da semente (MARTIN; MARTÍNEZ-ANDÚJAR; NONOGAKI, 2012).

1.3. Histórico e características dos RNAs não codificadores

No ano de 1970, o cientista Francis Crick enunciou o Dogma Central da Biologia Molecular, descrito sumariamente como: “O DNA sofre replicação dando origem a novas moléculas de DNA, depois é transcrito em RNA, e este por sua vez, traduz o código genético em proteínas” (CRICK, 1970). Por muitos anos, os RNAs foram considerados meros coadjuvantes do fluxo da informação gênica. Os avanços científicos ao longo das décadas contribuíram para o aperfeiçoamento do dogma, além de revelarem outros importantes

mecanismos envolvidos na síntese de proteínas, como, por exemplo, modificações pós-replicacionais, transcricionais e traducionais, bem como os processos de regulação mediados por RNAs. Atualmente, como parte da extensão do dogma central, considera-se que os RNAs são moléculas fundamentais para diversos eventos celulares, nos mais variados organismos, fato esse esclarecido por Walter Gilbert, em 1986, na hipótese do mundo de RNA, como sendo a primeira forma de vida na Terra e agente de armazenamento e de catálise (GILBERT, 1986; MOREIRA, 2015).

Os RNAs podem ser divididos em: RNAs mensageiros (mRNAs), os quais são traduzidos em proteínas, e RNAs não codificadores ou não codificantes (*non-coding RNAs* – ncRNAs). Os ncRNAs correspondem a uma classe de RNAs que não codificam proteínas, mas regulam uma miríade de processos biológicos em animais e plantas. Os mais conhecidos são o RNA ribossomal (rRNA) e transportador (tRNA), descobertos na década de 1950, que atuam durante a tradução do RNA mensageiro (HÜTTENHOFER; SCHATNER; POLACEK, 2005; CECH; STEITZ, 2014). É importante notar que, conforme aumenta a complexidade dos organismos, maior a quantidade de sequências não codificadoras (TAFT; PHEASANT; MATTICK, 2007). A partir do sequenciamento dos genomas de diferentes eucariotos superiores, foi visto que a quantidade de genes codificadores de proteínas foi menor do que o previsto. Por exemplo, levando em consideração apenas as sequências gênicas codificadoras, os humanos seriam menos complexos que *Oryza sativa* (arroz). Isso sugere que a regulação feita pelos ncRNAs foi crucial para o aumento da complexidade de organismos superiores ao longo do processo evolutivo (MATTICK, 2001; TAFT; MATTICK, 2003).

Os avanços das técnicas de sequenciamento e das ferramentas de bioinformática propiciaram a descoberta de novos tipos de ncRNAs de grande relevância, tanto em nível transcricional, quanto pós-transcricional. Os ncRNAs podem ser subdivididos em grupos (Figura 3), conforme as funções que desempenham, local de origem no genoma ou quantidade de nucleotídeos. Por exemplo, quanto ao tamanho, podem ser classificados em: RNAs longos não codificadores (*long non-coding RNAs* – lncRNAs), cujo tamanho é superior a 200 nucleotídeos (nt) de comprimento; e pequenos RNAs (*small RNAs* –

sRNAs), que possuem cerca de 20 a 30 nt (GROßHANS; FILIPOWICZ, 2008; QU; ADELSON, 2012; RAMIREZ-PRADO et al., 2017).

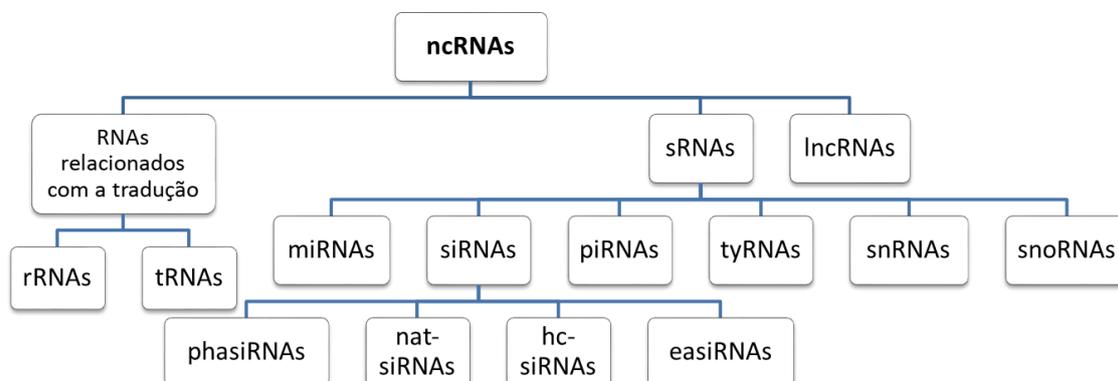


Figura 3: Classificação sumarizada dos RNAs não codificadores.

Após a identificação dos rRNAs e tRNAs, em 1968 foram descobertas novas classes de pequenos RNAs, que variavam de 100 a 180 nt, no nucleoplasma e nucléolo de células HeLa (WEINBERG; PENMAN, 1968). Mais adiante, estudos mais profundos demonstraram que esses RNAs, anteriormente isolados juntos, se situavam em regiões celulares diferentes, sendo os pequenos RNAs nucleares (*small nuclear RNAs* – snRNAs) localizados no núcleo, e os pequenos RNAs nucleolares (*small nucleolar RNAs* – snoRNAs) localizados no nucléolo (ZIEVE; PENMAN, 1976). Os snRNAs são considerados elementos chave no processo de *splicing*. Tais RNAs se associam a proteínas, formando as partículas ribonucleoproteicas, denominadas snRNPs (*small nuclear ribonucleoprotein*). Os snRNPs, por sua vez, são componentes do espliceossomo, complexo que realiza o *splicing* em pré-mRNAs (DREYFUSS; PHILIPSON; MATTAJ, 1988). Já os snoRNAs atuam principalmente na maturação de rRNAs, que inclui os processos de metilação e pseudouridilação. Os snoRNAs são capazes de se associar a proteínas conservadas, originando os complexos snoRNPs (*small nucleolar ribonucleoprotein*), os quais medeiam a modificação de nucleotídeos em rRNAs, propiciando a clivagem dos precursores de rRNAs (MAXWELL; FOURNIER, 1995; BERTRAND; FOURNIER, 2013). Além disso, estudos mais recentes demonstraram que snoRNAs podem ter outros tipos de RNAs alvos,

como snRNAs, tRNAs e até mRNAs (BACHELLERIE; CAVAILLÉ; HÜTTENHOFER, 2002).

Os primeiros RNAs longos foram descritos em 1971, mas foi apenas no início dos anos 1990 que o papel regulatório desses RNAs foi relatado (BRANNAN et al., 1990). Os lncRNAs regulam a expressão gênica nos níveis: pré-transcricional, por meio da interação com complexos remodeladores de cromatina; transcricional, interferindo na organização espacial do genoma e na transcrição de genes codificadores; e pós-transcricional, regulando a estabilidade, degradação e *splicing* de mRNAs, além de modular a tradução (HU; ALVAREZ-DOMINGUEZ; LODISH, 2012; QUAN; CHEN; ZHANG, 2015; SIENA; BARROS, 2017). No nível pós-transcricional, os lncRNAs também possuem uma importante função como “esponjas” de microRNAs (miRNAs). Esse processo ocorre quando lncRNAs possuem sítios de ligação a miRNAs. Os lncRNAs que possuem regiões complementares podem sequestrar miRNAs e impedi-los de alcançar seus genes alvos, conseqüentemente, afetando a expressão dos mesmos (ANGRAND et al., 2015).

Devido ao curto tamanho, sRNAs de 20–30 nt, foram caracterizados mais recentemente, em relação aos snRNAs, snoRNAs e lncRNAs (GROßHANS; FILIPOWICZ, 2008; MORRIS; MATTICK, 2014). De forma geral, as três classes de pequenos RNAs consideradas mais importantes e melhor elucidadas são: microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs de interferência (*small interfering RNA* – siRNAs) e RNAs de interação com a proteína PIWI (*PIWI-interacting RNA* – piRNAs) (GROßHANS; FILIPOWICZ, 2008; ZHANG, 2009), descritos a seguir.

Os miRNAs constituem uma classe de sRNAs endógenos com cerca de 21 nt de comprimento, capazes de regular negativamente a expressão gênica a nível pós-transcricional em animais, plantas e vírus. A regulação é feita principalmente através da clivagem de RNAs mensageiros específicos e/ou inibição da tradução (BARTEL, 2004; ZHANG; WANG; PAN, 2007). O primeiro miRNA foi descoberto em 1993, quando observado que o gene *lin-4*, envolvido no controle do desenvolvimento larval em *Caenorhabditis elegans*, não era codificador de proteínas, mas gerava pequenos RNAs (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993). Em 2001, os miRNAs foram reconhecidos como uma classe abundante de sRNAs regulatórios, conservados evolutivamente entre

diferentes organismos (LEE; AMBROS, 2001; BARTEL, 2004). Os miRNAs são processados a partir de um RNA longo de fita simples, que se dobra formando uma estrutura característica em forma de *hairpin*. O processamento do miRNA precursor envolve um conjunto de enzimas e outras proteínas que atuam de forma bem coordenada para gerar o miRNA maduro (detalhado no item 1.3.1.) (GROßHANS; FILIPOWICZ, 2008).

Os siRNAs foram observados pela primeira vez em 1999. Até então, somente alguns elementos envolvidos no processo de silenciamento gênico pós-transcricional eram elucidados (HAMILTON; BAULCOMBE, 1999). Os siRNAs possuem cerca de 20–24 nt e são gerados a partir de uma molécula de RNA dupla fita (*double-stranded RNA* – dsRNA), geralmente originada por vírus ou elementos transponíveis (transposons). A molécula de dsRNA é processada por uma endorribonuclease do tipo III chamada DICER, gerando um duplex de siRNAs. A fita siRNA guia se acopla a uma proteína ARGONAUTA, formando o complexo RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*), que irá reconhecer e clivar mRNAs-alvo complementares (ELBASHIR et al., 2001; AXTELL, 2013). Os siRNAs se subdividem em três principais grupos: pequenos RNAs de interferência secundários e em fase (*phased, secondary, small interfering RNA* – phasiRNA), pequenos RNAs de interferência derivados de um transcrito antissenso natural (*natural antisense transcript-derived small interfering RNA* – nat-siRNA) e pequenos RNAs de interferência associados à heterocromatina (*heterochromatic siRNA* – hc-siRNA) (AXTELL, 2013; BORGES; MARTIENSSEN, 2015).

Os phasiRNAs foram relatados pela primeira vez no ano de 2004 na planta modelo *Arabidopsis thaliana* (PERAGINE et al., 2004; VAZQUEZ et al., 2004). Os siRNAs secundários são assim denominados pois a síntese é desencadeada por outro tipo de pequeno RNA. A biossíntese dos phasiRNAs começa com a geração de transcritos precursores de fita simples (*single-stranded RNA* – ssRNA) pela enzima RNA polimerase II a partir do locus *PHAS*. O transcrito *PHAS* é clivado por um miRNA geralmente de 22 nt, denominado miRNA desencadeador ou ativador. Em seguida, a enzima RNA polimerase dependente de RNA (*RNA-dependent RNA polymerase* – RDR) sintetiza uma cadeia complementar ao transcrito, gerando um dsRNA, o qual é processado pela enzima DICER em phasiRNAs de 21 ou 24 nt. Uma das fitas

dos phasiRNAs gerados se associa à proteína ARGONAUTA, e a partir de então, irá atuar no silenciamento pós-transcricional do mRNA-alvo (FEI; XIA; MEYERS, 2013; KOMIYA, 2017; MATHIONI; MEYERS, 2017). Os phasiRNAs podem ter ação em *cis* ou *trans*. Quando o RNA-alvo do phasiRNA é seu próprio transcrito precursor, é chamado *cis-acting siRNA* (casiRNA), e quando o alvo é diferente do seu próprio transcrito, é chamado de *trans-acting siRNA* (tasiRNA). Já quando o alvo ainda é desconhecido ou não caracterizado, são considerados genericamente phasiRNAs (ZHAI et al., 2011; MATHIONI; MEYERS, 2017).

Em 2005, foram descritos os nat-siRNAs de 21–24 nt em *Arabidopsis*, relacionados com a modulação da tolerância à salinidade (BORSANI et al., 2005). O precursor dsRNA dos nat-siRNAs é formado pela hibridização de dois transcritos independentes, porém complementares. Dessa forma, diferentemente das demais classes de siRNAs, demonstrou-se até então que os nat-siRNAs não seriam dependentes de uma RDR para sintetizar o precursor dsRNA. Entretanto, há pesquisas que demonstram que a enzima RDR é necessária para a acumulação de nat-siRNAs. Investigações mais profundas são necessárias para elucidar os processos envolvidos na biossíntese dos nat-siRNAs (AXTELL, 2013; BORGES; MARTIENSSEN, 2015).

Uma terceira classe de siRNAs são os hc-siRNAs, com 24 nt, derivados de elementos transponíveis e regiões repetitivas. A biossíntese dos hc-siRNAs é dependente da RNA polimerase IV para transcrição, e da RDR2 para a síntese do dsRNA, processado pela enzima DICER3 em hc-siRNAs. Esses pequenos RNAs participam do silenciamento gênico transcricional via um processo conhecido como metilação do DNA mediada por RNA (*RNA-directed DNA Methylation* – RdDM). Dessa forma, os hc-siRNAs possuem um importante papel na mediação da metilação de sequências do genoma, bem como na manutenção de regiões heterocromáticas (AXTELL, 2013; BORGES; MARTIENSSEN, 2015; WANG; AXTELL, 2017).

Outra classe de siRNAs relacionada com a regulação epigenética foi descoberta mais recentemente em *Arabidopsis*, os chamados siRNAs ativadas epigeneticamente (*epigenetically activated siRNAs* – easiRNAs). A biogênese dos easiRNAs pode ser desencadeada por miRNAs, a partir de transposons reativados transcionalmente, numa via semelhante a dos tasiRNAs

(CREASEY et al., 2014; KOCH, 2014). O transcrito derivado do transposon reativado é reconhecido pela RDR6, dando origem a um dsRNA, que, por sua vez, é processado por enzimas DICER-LIKE em easiRNAs de 21 nt e 22 nt, os quais atuam contra o RNA do próprio transposon. Os easiRNAs operam somente quando os sistemas epigenéticos que controlam transposons são desativados, e funcionam como um mecanismo de *backup* para conter transposons (SARAZIN; VOINNET, 2014; CREASEY et al., 2014).

Além dos miRNAs e siRNAs, há uma importante classe de sRNAs denominada piRNAs. Essa classe de pequenos RNAs de 26 a 30 nt foi descrita em 2005, e é caracterizada pela interação com proteínas PIWI (*P-element-induced wimpy testis*), uma subclasse de proteínas ARGONAUTA, requerida para o desenvolvimento de células germinativas em animais (MORRIS; MATTICK, 2014; IWASAKI; SIOMI; SIOMI, 2015). Os piRNAs formam um complexo de silenciamento induzido por RNA (piRISC) e reprimem transposons a nível transcricional ou pós-transcricional (IWASAKI; SIOMI; SIOMI, 2015; BORGES; MARTIENSSEN, 2015). Até o momento, não há relatos de piRNAs em plantas (AXTELL, 2013).

Uma nova classe de pequenos RNAs, até então não explorada em plantas, foi relatada em *Arabidopsis* por Baldrich e colaboradores, no ano de 2019: os *tiny RNAs* (tyRNAs). Essa classe de sRNAs possui de 10 a 17 nt e é encontrada em vesículas extracelulares. O mapeamento dos tyRNAs no genoma de *Arabidopsis* mostrou que possuem uma origem genômica ampla, podendo ser derivados de mRNA, rRNA e precursores de miRNAs. A função biológica dos tyRNAs ainda não é compreendida, e podem corresponder a resíduos ou subprodutos de degradação (BALDRICH et al., 2019).

1.3.1. MicroRNAs em plantas

Nos vegetais, os miRNAs estão relacionados a diversos estádios de desenvolvimento, como: transição da fase juvenil para a fase adulta (HUIJSER; SCHMID, 2011), desenvolvimento foliar (YANG et al., 2018), iniciação e desenvolvimento de órgãos reprodutivos (LI; ZHANG; CHEN, 2015), formação de frutos (RIPOLL et al., 2015) e crescimento do sistema radicular (KHAN et al., 2011), além de atuarem na regulação hormonal (CURABA; SINGH;

BHALLA, 2014), resposta a estresses ambientais (SUNKAR; LI; JAGADEESWARAN, 2012) e interação com patógenos (ISLAM et al., 2018). Apesar de o primeiro miRNA ter sido descoberto em 1993 no nematódeo *C. elegans* (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993), o primeiro relato dessa classe de sRNAs em plantas ocorreu somente em 2002, na espécie *A. thaliana* (REINHART et al., 2002; PARK et al., 2002).

A biogênese dos miRNAs em plantas se inicia a partir da transcrição do miRNA primário (pri-miRNA) por genes MIR, promovida pela enzima RNA polimerase II (Pol II) (Figura 4). O transcrito primário, possuindo um cap 7-metil-guanosina em sua extremidade 5' e uma cauda poli-A na extremidade 3', é então convertido em um precursor, o pré-miRNA, através 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 HUA1 (HUA-ENHANCER 1) e transportado para o citoplasma pela proteína de membrana HASTY. Assim, o miRNA maduro é incorporado ao complexo RISC, contendo a proteína ARGONAUTA 1 (AGO1), enquanto a fita miRNA* é direcionada para a degradação. Por fim, o miRNA acoplado ao complexo RISC irá atuar na regulação da expressão gênica, podendo clivar RNAs mensageiros, inibir a tradução e, em alguns casos, induzir a metilação do DNA (YU; JIA; CHEN, 2017; ARMENTA-MEDINA; GILLMOR, 2019).

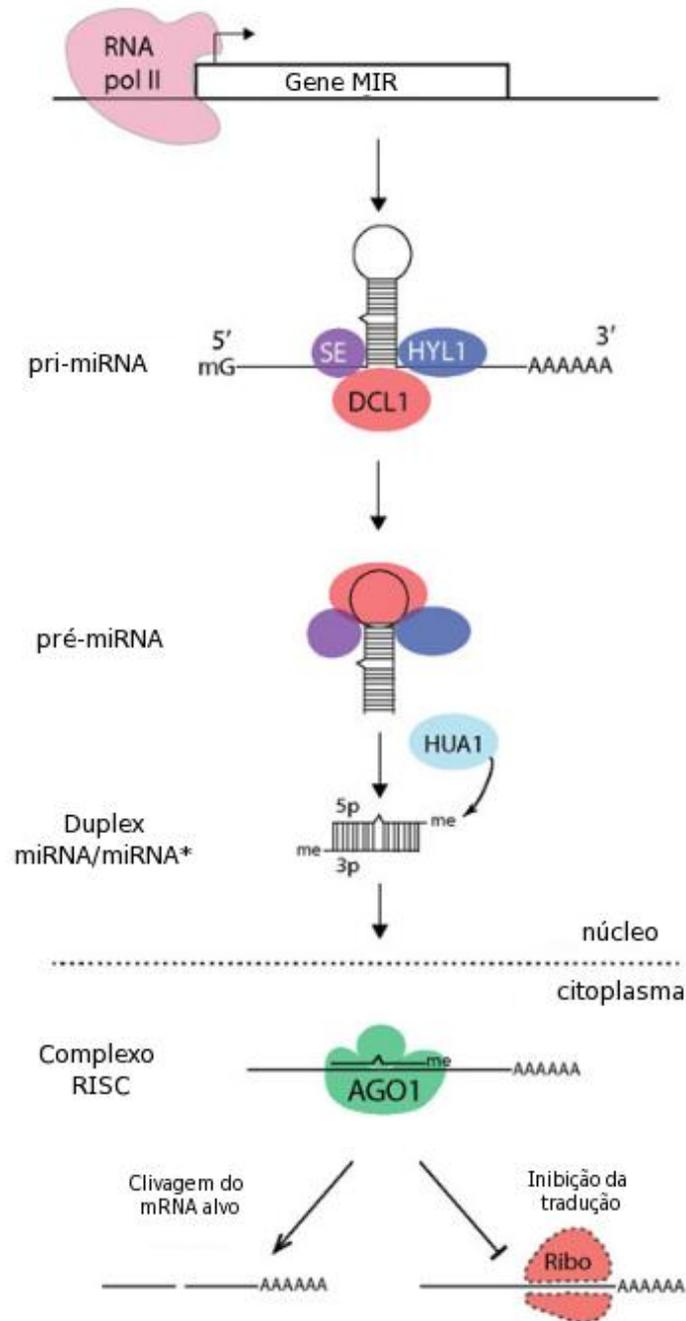


Figura 4: Biogênese dos microRNAs em plantas (Adaptado de ARMENTA-MEDINA; GILLMOR, 2019).

Nos últimos anos, investigações experimentais e computacionais permitiram um grande avanço no estudo dos miRNAs em plantas. O uso de novas tecnologias de sequenciamento (*Next-generation sequencing* – NGS), como o RNA-seq, permite não somente analisar a expressão de pequenos RNAs, como também fornece a região de origem no genoma (BEREZIKOV; CUPPEN; PLASTERK, 2006). Nesse sentido, o emprego de ferramentas de

bioinformática é crucial para a interpretação dos dados gerados por NGS, principalmente no intuito de detectar novos miRNAs. Para a identificação de miRNAs por meio de abordagens computacionais, são utilizados algoritmos para prever miRNAs candidatos, considerando, por exemplo, características estruturais das sequências e comprimento dos precursores e miRNAs maduros (BEREZIKOV; CUPPEN; PLASTERK, 2006; HERTEL; LANGENBERGER; STADLER, 2014; AXTELL; MEYERS, 2018).

Com o aumento dos miRNAs identificados nas mais variadas espécies, foram criados bancos de dados de domínio público, que disponibilizam suas sequências e anotação online. O principal e mais abrangente repositório é o miRBase (<http://www.mirbase.org>), que armazena, em sua versão mais recente (versão 22.1, de outubro de 2018), 38.589 precursores de miRNAs e 48.860 miRNAs maduros em 271 espécies. Na família Fabaceae estão disponíveis 1.960 sequências de miRNAs maduros, das quais 756 ocorrem em *G. max* (GRIFFITHS-JONES, 2004; KOZOMARA; BIRGAOANU; GRIFFITHS-JONES, 2019).

1.3.1.1. Regulação da embriogênese de sementes mediada por miRNAs

Antes mesmo da formação da semente, os miRNAs atuam durante a fertilização da planta, mediando diferentes processos no desenvolvimento reprodutivo masculino e feminino (LI; ZHANG; CHEN, 2015). Por exemplo, em *Arabidopsis* foi visto que o miR167 tem como alvos os fatores de resposta a auxina ARF6 e ARF8, os quais regulam o desenvolvimento do gineceu e estame. Em mutantes, a perda da regulação do miR167 resultou em óvulos não desenvolvidos, e a antera cresceu de forma anormal, impedindo a liberação do grão de pólen (WU; TIAN; REED, 2006).

Pesquisas evidenciaram que a perda de função em miRNAs durante a formação de sementes resulta em letalidade embrionária, defeitos embrionários graves ou formação anormal de plântulas após a germinação (LIU et al., 2007). Diferentes estudos feitos em *Arabidopsis* mostraram que os miRNAs atuam em todos os estádios da embriogênese da semente (MARTIN; MARTÍNEZ-ANDÚJAR; NONOGAKI, 2012). Durante o estágio globular, o miR156 promove a repressão dos fatores de transcrição SPL10 (*Squamosa Promoter-Binding*

Protein-Like 10) e SPL11, impedindo que genes expressos no estágio maduro sejam precocemente expressos em estádios iniciais da embriogênese. Dessa forma, os miRNAs contribuem para a formação do padrão embrionário adequado (NODINE; BARTEL, 2010). No estágio de coração, o miR160 tem um papel fundamental na regulação dos níveis de auxina, determinante para formação da similaridade bilateral. Plantas com uma versão resistente do ARF17 ao miR160 exibiram simetria tri e quadrilateral, resultando em um ou dois cotilédones a mais (MALLORY; BARTEL; BARTEL, 2005). Durante o estágio torpedo-cotiledonar, a família miR164 regula a formação dos cotilédones, direcionando a regulação de fatores de transcrição CUC1 (*Cup-Shaped Cotyledon1*) e CUC2. Plantas expressando CUC1 resistente ao miR164 apresentaram cotilédones com defeitos de orientação, além de alterações durante o desenvolvimento vegetativo e floral (MALLORY et al., 2004). O miR159 atua durante o estágio maduro do embrião, regulando os fatores de transcrição MYB33 e MYB65. Plantas mutantes que tiveram a regulação do miR159 afetada exibiram sementes com tamanho reduzido e formato irregular (ALLEN et al., 2007; MARTIN; MARTÍNEZ-ANDÚJAR; NONOGAKI, 2012).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo principal identificar microRNAs conhecidos e novos que regulam a expressão gênica durante a embriogênese e maturação de sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merrill].

2.2. Objetivos específicos

A – Analisar o perfil de expressão de miRNAs conservados tecido a tecido de sementes de soja durante os estádios globular, coração, cotiledonar e maduro.

B – Identificar novos miRNAs a partir das bibliotecas de pequenos RNAs utilizadas, bem como seus perfis de expressão e potenciais alvos;

C – Identificar phasiRNAs gerados pelos miRNAs conhecidos;

D – Testar a viabilidade de utilização da técnica FASTmiR na identificação experimental de miRNAs.

3. METODOLOGIA

3.1. Obtenção das bibliotecas de pequenos RNAs e filtragem dos arquivos

A identificação de miRNAs conhecidos e novos relacionados com a embriogênese e maturação de sementes de soja envolveu diferentes ferramentas de bioinformática e o uso de banco de dados (Figura 5). Inicialmente, foram obtidas as bibliotecas de pequenos RNAs, geradas a partir do sequenciamento realizado pela plataforma Illumina Hiseq 2000, e disponíveis no banco de dados *Gene Networks in Seed Development* (<http://seedgenenetwork.net>). Foram analisadas bibliotecas dos diferentes tecidos da semente de soja, em cada estágio da embriogênese, sendo seis compartimentos do estágio globular, sete compartimentos do estágio de coração, oito compartimentos do estágio cotiledonar e 17 compartimentos do estágio maduro, considerando as réplicas biológicas de cada sub-região, perfazendo 107 arquivos. Os números de acesso das bibliotecas de cada estágio no *Gene Expression Omnibus* (GEO/NCBI) são, respectivamente: GSE57845, GSE57874, GSE57883 e GSE57906. Os arquivos foram baixados no formato *Sequence Read Archive* (SRA) e convertidos no formato FASTQ utilizando o SRA Toolkit do NCBI (<http://ncbi.github.io/sra-tools>). Os arquivos em FASTQ passaram pelo processo de filtragem dos *reads* (leituras curtas provenientes do sequenciamento Illumina), utilizando o *pipeline* para filtragem de sRNAs da *University of East Anglia* (UEA) (<http://srna-workbench.cmp.uea.ac.uk/>) (STOCKS et al., 2012). Para isto, primeiramente foi realizada a “trimagem” das sequências de adaptadores na extremidade 3’ das sequências. Em seguida, os arquivos foram filtrados quanto aos seguintes parâmetros: tamanho (de 18 a 28 nt); baixa complexidade, em que sequências contendo menos de três nucleotídeos distintos foram removidas; sequências inválidas, em que as sequências que não continham nucleotídeos conhecidos foram descartadas; sequências de tRNAs, rRNA, snRNAs, snoRNAs e precursores, provenientes dos bancos de dados RFAM (GRIFFITHS-JONES et al., 2003), *Genomic tRNA Database* (CHAN; LOWE, 2009) e EMBL (STOESSER et al., 1999), as quais também foram removidas.

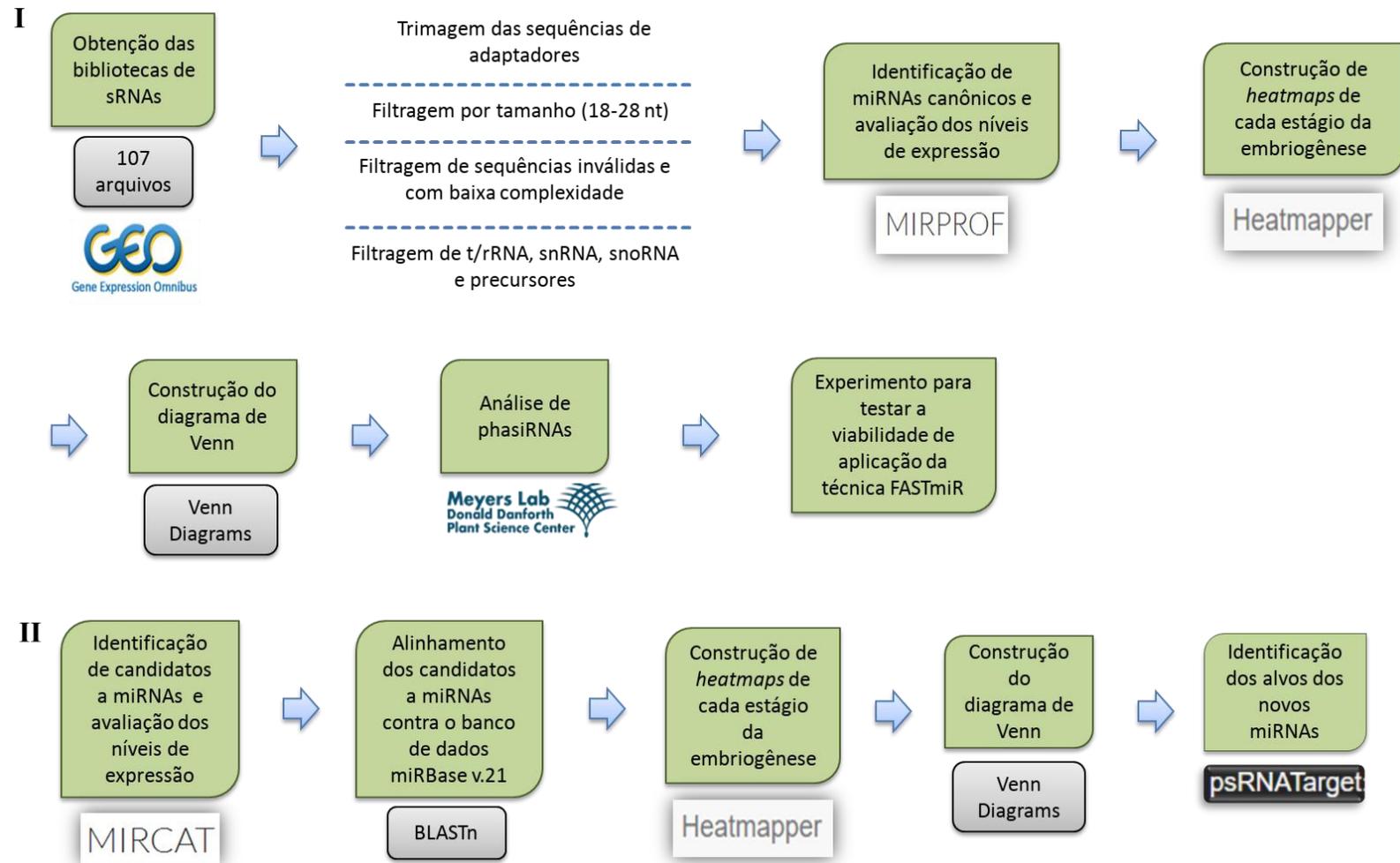


Figura 5: Esquema demonstrando as etapas metodológicas empregadas para a análise de miRNAs conhecidos (I) e novos (II) envolvidos na regulação da embriogênese e maturação de sementes de soja.

3.2. Identificação de miRNAs canônicos e avaliação dos níveis de expressão em cada estágio de desenvolvimento

Após os processos de “trimagem” e filtragem, os arquivos foram submetidos ao software miRProf (<http://srna-workbench.cmp.uea.ac.uk/mirprof/>), também utilizando o *pipeline* da UEA, a fim de identificar os miRNAs conhecidos nas bibliotecas de sRNAs utilizadas. O miRProf foi executado com sRNAs de tamanho mínimo de 18 nt e máximo de 28 nt, não permitindo nenhum *mismatch* (pareamento imperfeito). As bibliotecas de sRNAs foram mapeadas contra as sequências de miRNAs canônicos maduros de plantas depositadas no banco de dados miRBase, versão 21 (<http://www.mirbase.org/>) (KOZOMARA; GRIFFITHS-JONES, 2014). Os sRNAs foram alinhados com o genoma de soja, versão 2.0, Gmax 275 Wm82.a2.v1, obtido no banco de dados Phytozome v. 12.1.5 (<http://www.phytozome.net>) (GOODSTEIN et al., 2012). Para permitir a comparação entre as bibliotecas, os valores totais das expressões de cada miRNA foram normalizados em *reads per million* (RPM). Os miRNAs com expressão acima de 15 RPM foram selecionados para a construção de *heatmaps* de cada estágio da embriogênese e maturação, através da ferramenta Heatmapper (<http://www.heatmapper.ca/expression/>) (BABICKI et al., 2016). A fim de diminuir a discrepância entre os valores, os dados normalizados em RPM foram convertidos em log₂ anteriormente à construção dos *heatmaps*.

3.3. Identificação de miRNAs novos e análise dos níveis de expressão

Os miRNAs não-canônicos (novos) foram identificados por meio da ferramenta miRCat2 (<http://srna-workbench.cmp.uea.ac.uk/mircat2/>) (PAICU et al., 2017), tendo como base o *pipeline* da UEA. Utilizando as bibliotecas de sRNAs filtradas, os *reads* foram mapeados no genoma de referência (Gmax 275 Wm82.a2.v1). As regiões genômicas que possuísem abundância de pelo menos cinco *reads* mapeados foram consideradas miRNAs candidatos, conforme os parâmetros preestabelecidos. Foram buscados miRNAs maduros com tamanho mínimo de 20 nt e máximo de 23 nt, e precursores com

comprimento mínimo de 45 nt e máximo de 250 nt. Apenas candidatos a miRNA que possuíam um miRNA* correspondente foram analisados. O miRCat2 analisa a estrutura secundária resultante para verificar se esta forma um *hairpin* de miRNA característico. O *hairpin* válido mais estável é então escolhido como o candidato a precursor de miRNA, sendo testado pelo Randfold. Com o software BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), os candidatos a miRNAs foram alinhados contra o banco de dados miRBase v.21, utilizando o BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool – Nucleotide*) (ALTSCHUL et al., 1997) com parâmetros padrão para remover sequências de miRNAs conhecidos. Foi feito um filtro manual para selecionar os miRNAs de 21 e 22 nt. As sequências que não obtiveram *hit* no miRBase, foram selecionadas como potenciais miRNAs novos. Também foi calculada a porcentagem de bases A, U, C e G nas sequências dos candidatos a miRNAs. Para avaliar o perfil de expressão, o valor de abundância de cada miRNA obtido no miRCat2, e o número total de *reads* que mapearam no genoma em cada biblioteca (obtido no miRProf), foram utilizados para calcular os valores normalizados em RPM. Os miRNAs com expressão acima de 15 RPM tiveram os valores convertidos para log2 e foram utilizados na construção dos *heatmaps*, por meio da ferramenta Heatmapper.

3.4. Diagramas de Venn

Os diagramas de Venn foram construídos para avaliar a quantidade de miRNAs comuns e específicos em cada estágio da embriogênese, tanto para os miRNAs canônicos, quanto para os novos. Para tal, foi utilizado o software Venn Diagrams (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn>).

3.5. Identificação de alvos dos miRNAs

Os alvos dos miRNAs foram preditos no programa psRNATarget, com parâmetros padrão e utilizando os transcritos de soja obtidos no Phytozome v.11 (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>) (DAI; ZHAO, 2011). Essa ferramenta permite identificar os possíveis alvos de miRNAs, a partir da

complementaridade de bases do miRNA com o transcrito alvo. Além disso, a ferramenta estima a forma de regulação do miRNA sobre o alvo (clivagem ou inibição da tradução). As anotações dos genes alvos foram buscadas no banco de dados SoyBase (<https://soybase.org/genomeannotation/>).

3.6. Análise de phasiRNAs gerados por miRNAs conhecidos

Para a busca de phasiRNAs, foi construído um banco de dados (Figura 6) no servidor web MPSS (NAKANO et al., 2020), em colaboração com o Dr. Blake Meyers e sua equipe, do Donald Danforth Plant Science Center (USA). Inicialmente, foi feito o upload de todos os arquivos anteriormente filtrados e convertidos em TagCount. O banco de dados construído com as bibliotecas de sRNAs permite a busca de phasiRNAs a partir de uma sequência de miRNA. As buscas foram feitas com miRNAs já descritos na literatura como desencadeadores de phasiRNAs em leguminosas: miR390, miR172, miR2109, miR2118, miR1507, miR1509 e miR1515 (ZHAI et al., 2011). Foram usadas as sequências dos miRNAs identificadas pelo miRProf.

legume soybean
Next-Gen Sequence DBs
sRNA Clícia

Home / Basic Queries Other Queries Library Information Analysis Apps Resources About Us

About This Database [FAQs](#)

Annotated species	<i>Glycine max</i>	Annotation built on	JGI 2.0 ?	Total number of genes	57,190
Library type	Small RNA	Total bp in genome	978,647,490	Protein coding	57,190
Total number of libraries	76	Total chrs or contigs	1,191	Transposon related	0
Genome DB	SOY_JGI2_genome	Last updated: 2019-10-07 05:47:44			
Expression DB	SOY_clícia_sRNA	Last updated: 2019-06-08 04:05:06			

Access to this web site and the data contained herein are provided for research purposes only. No commercial rights of any nature are granted.

Basic Queries

Please enter specific information to retrieve data.
Adjust libraries/reads to display on the [control panel](#) (optional).

Protein or gene ID Bulk Query Using a v1 gene identifier? SpyBase version converter	<input type="text"/>	<input type="button" value="Go"/>	<input checked="" type="radio"/> Gene analysis viewer <input type="radio"/> Library abundance viewer
Cluster or coordinate ID Bulk Query	<input type="text"/>	<input type="button" value="Go"/>	<input checked="" type="radio"/> Cluster ID ('SOY_JGI2.[chr_id].[start].[length]') <input type="radio"/> Coordinate ID ('SOY_JGI2.[chr_id].[start].[end]')
Sequence of small RNA read Bulk Query	<input type="text"/>	<input type="button" value="Go"/>	
Keyword for genes/proteins or repeats	<input type="text"/>	<input type="button" value="Go"/>	<input checked="" type="radio"/> Genes <input type="radio"/> Repeats

e.g. [GLYMA01G000100.Wm82.a2.v1](#)
e.g. [SOY_JGI2_1.2001.500](#) (cluster) [SOY_JGI2_1.2001.4500](#) (coordinate)
e.g. [TTAGGGGTTAGGGTTAGGGTT](#)
e.g. [MIRNA](#) [LTR](#)

Figura 6: Imagem ilustrativa da página correspondente ao banco de dados construído para a análise de phasiRNAs. Em vermelho, é destacado o campo em que as sequências de miRNAs foram inseridas para a busca de phasiRNAs.

3.7. Aplicação da técnica FASTmiR

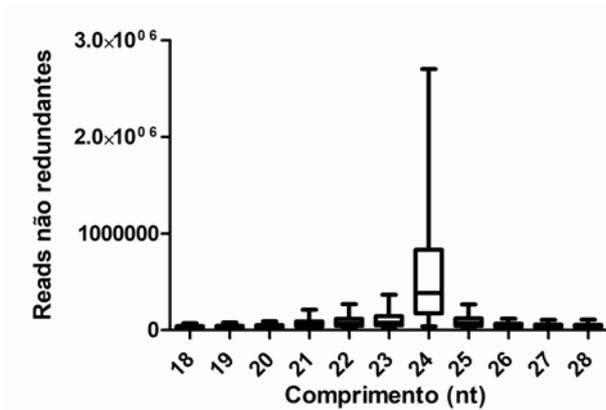
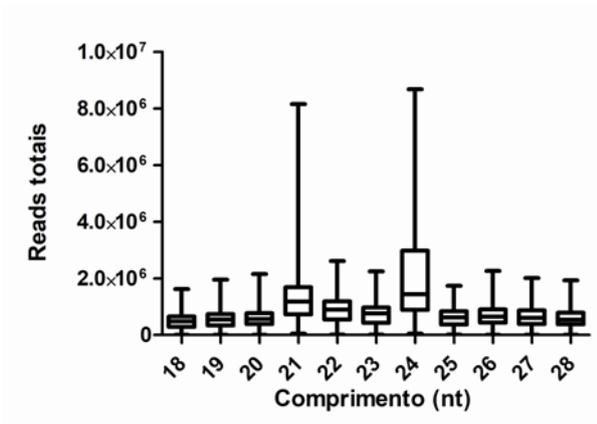
Foi testada a viabilidade de aplicação da técnica FASTmiR para posterior validação experimental dos níveis de expressão dos miRNAs durante o desenvolvimento de sementes de soja. Essa técnica é baseada em um sensor fluorescente que permite detectar e quantificar os níveis miRNAs *in vivo* ou *in vitro* (HUANG et al., 2017). Os miRNAs-alvo se ligam a uma sonda complementar previamente desenhada, que exibe fluorescência ao se ligar ao fluoróforo 3,5-difluoro-4-hidroxibenzilideno imidazolinona (DFHBI). Neste experimento, foi avaliada a emissão de fluorescência do DFHBI ao se ligar à sonda FASTmiR específica para o miRNA de interesse. Foram utilizadas três amostras: I) 10 µl de água ultrapura + 10 µl de DFHBI; II) 10 µl da sonda FASTmiR + 10 µl de água ultrapura; III) 10 µl da sonda FASTmiR + 10 µl de DFHBI, incubados por 30 minutos em temperatura ambiente. As imagens de fluorescência foram obtidas com o microscópio de fluorescência Zeiss Axio Imager A.2, com 458 nm de excitação e 500–550 nm de emissão. Para construir o gráfico de intensidade média de fluorescência, foi utilizado o software AxioVision 3.8.

4. RESULTADOS

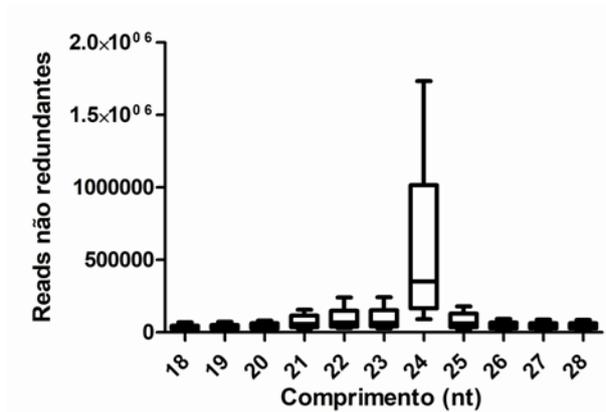
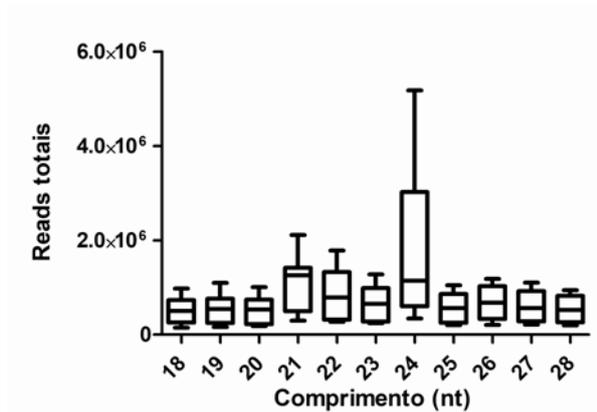
4.1. Análise das bibliotecas de pequenos RNAs

Após os procedimentos de filtragem dos arquivos, foi possível obter a distribuição dos sRNAs quanto ao tamanho, de 18 nt a 28 nt, em relação aos *reads* redundantes (totais) e não redundantes (únicos). A Figura 7A representa a soma dos *reads* de todas as bibliotecas de sRNAs, considerando todos os estádios da embriogênese e maturação. Os sRNAs que apresentaram maior abundância em relação aos *reads* totais foram os sRNAs de 21 nt e 24 nt. No entanto, após a remoção das redundâncias, os sRNAs de 21 nt tiveram a proporção reduzida, permanecendo semelhantes aos demais comprimentos de sRNAs. Observou-se novamente um pico de sRNAs com 24 nt nos *reads* não redundantes (Figura 7A), e esse padrão se manteve quando a distribuição de tamanho dos sRNAs foi analisada por estádio, como mostrado na Figura 7B–E, referentes aos estádios globular, coração, cotiledonar e maduro, respectivamente. No estádio globular, foram obtidos aproximadamente 379 milhões de *reads* totais e 94 milhões de *reads* não redundantes, distribuídos em seis compartimentos/tecidos da semente, como listado na Tabela 1. A quantidade de *reads* mostrada em cada compartimento é referente à soma dos *reads* das réplicas biológicas de cada biblioteca de sRNA. No estádio de coração, aproximadamente 482 milhões de *reads* redundantes e 105 milhões de *reads* não redundantes foram obtidos, distribuídos em sete compartimentos da semente. Já no estádio cotiledonar, são exibidos cerca de 520 milhões de *reads* totais e 177 milhões de sequências únicas, em oito compartimentos da semente. E no estádio maduro, foram obtidos aproximadamente um bilhão de *reads* redundantes e 349 milhões de *reads* não redundantes, distribuídos em 17 tecidos da semente (Tabela 1).

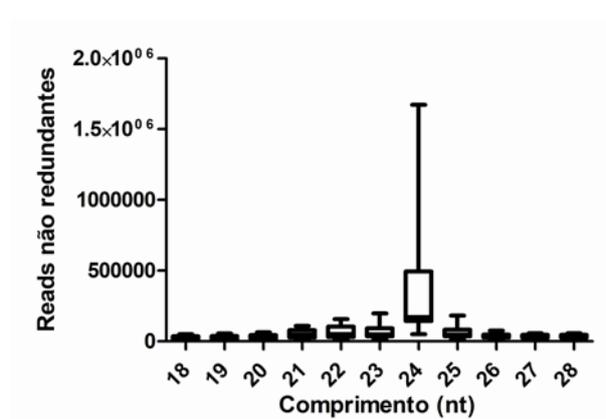
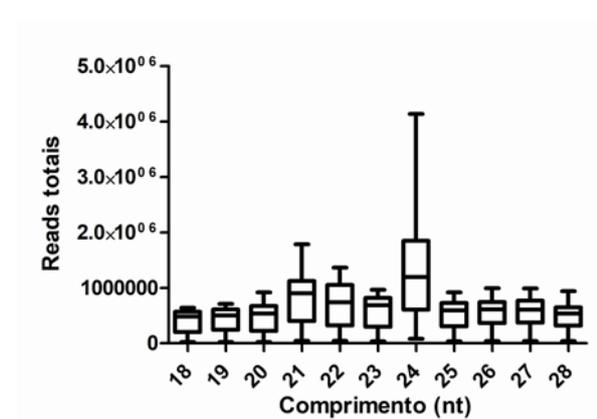
A



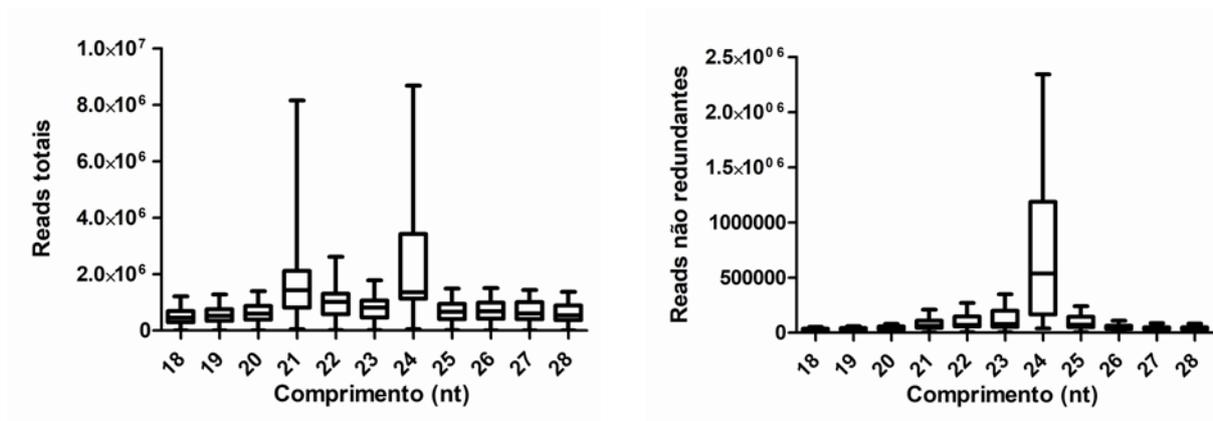
B



C



D



E

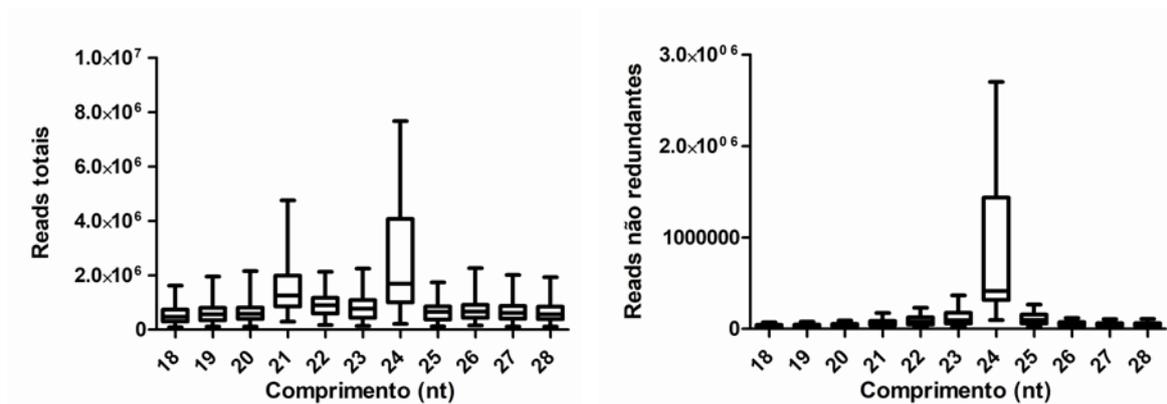


Figura 7: Distribuição de tamanho das sequências de sRNAs após a filtragem dos *reads* quanto ao comprimento (18-28 nt), considerando os *reads* totais e *reads* não redundantes, nos quatro estádios da embriogênese (A), e separadamente nos estádios globular (B), coração (C), cotiledonar (D) e maduro (E).

Tabela 1: Número de *reads* antes e após a filtragem das bibliotecas de sRNAs de sementes com embriões nos estádios globular, coração, cotiledonar e maduro em soja.

Estádio	Compartimentos	Reads totais	Reads não redundantes
Globular	Integumento interno	78272235	8743245
	Endosperma	57267345	13102128
	Epiderme	53304092	15055053
	Embrião propriamente dito	59543641	17969687
	Integumento externo	57904961	21201917
	Hilo	73100040	18684677
Coração	Suspensor	82732343	16078937
	Integumento interno	63225502	13316993
	Epiderme	71706331	13470157
	Endotélio	98391893	19313199
	Integumento externo	63324485	15424854
	Endosperma	51982827	11771714
	Embrião propriamente dito	51400881	15727263
Cotiledonar	Integumento interno	80155797	16272601
	Endosperma	107990432	20219744
	Eixo do embrião	27273804	13099658
	Embrião propriamente dito	43302406	21879959
	Integumento externo	94511813	29570209
	Hilo	44082598	15705773
	Epiderme	83672795	46155470
	Região cotiledonar do embrião	39682989	14958038
Maduro	Epiderme do eixo	35582190	14933224
	Plúmula	52029583	25129081
	Parênquima do eixo	35842988	10900921

Maduro	Meristema apical da raiz	82339433	33784342
	Meristema apical da parte aérea	73370248	25439350
	Estelo	43392383	20154029
	Feixe vascular do eixo	73881391	20752592
	Epiderme abaxial do cotilédone	59357470	16382350
	Parênquima abaxial do cotilédone	54628458	15228447
	Epiderme adaxial do cotilédone	59576927	16416676
	Parênquima adaxial do cotilédone	53452976	18154370
	Feixe vascular do cotilédone	80288870	20793164
	Endosperma	114398792	23585906
	<i>Hourglass</i>	60105871	14244554
	Hilo	89119963	35798743
	Camada paliçádica do tegumento	58255303	24766572
	Parênquima do tegumento	36200631	13506364

4.2. Identificação de miRNAs conhecidos e análise do perfil de expressão

A partir das análises realizadas no programa miRProf, foi possível identificar os miRNAs conhecidos presentes nas bibliotecas de sRNAs utilizadas. Nas bibliotecas de sRNAs referentes ao estágio globular, foram mapeados 171 miRNAs no genoma de soja. Destes, foram selecionados apenas os miRNAs que apresentaram expressão acima de 15 RPM, em pelo menos um compartimento da semente, perfazendo 49 miRNAs. Nas sementes com embriões no estágio de coração, foram mapeados 176 miRNAs, dos quais 50 exibiram expressão acima de 15 RPM. No estágio cotiledonar, 204 miRNAs mapearam no genoma. Após desconsiderar os miRNAs com expressão abaixo de 15 RPM, foram selecionados 61 miRNAs. Já no estágio maduro, foram identificados 216 miRNAs, dos quais 56 apresentaram expressão acima de 15 RPM. Os miRNAs selecionados em todos os estágios foram utilizados na

construção do diagrama de Venn, para avaliar quais famílias de miRNAs são expressas entre os estádios (Figura 8). Do total, 39 miRNAs foram comuns entre as bibliotecas de todos os estádios – globular, coração, cotiledonar e maduro. O estádio globular não apresentou nenhum miRNA específico. O estádio de coração mostrou um miRNA exclusivo, o miR9753. No estádio cotiledonar, foram encontrados três miRNAs específicos: miR395, miR397 e miR4996. E no estádio maduro, os miRNAs miR5374 e miR5072 foram específicos. No total, foram identificados 66 miRNAs conhecidos entre todas as bibliotecas, considerando os miRNAs que se repetem entre os estádios e os que são exclusivos. Na tabela 2, estão listados os 39 miRNAs comuns em todos os estádios, e suas respectivas sequências, considerando as isoformas que apresentaram maior abundância.

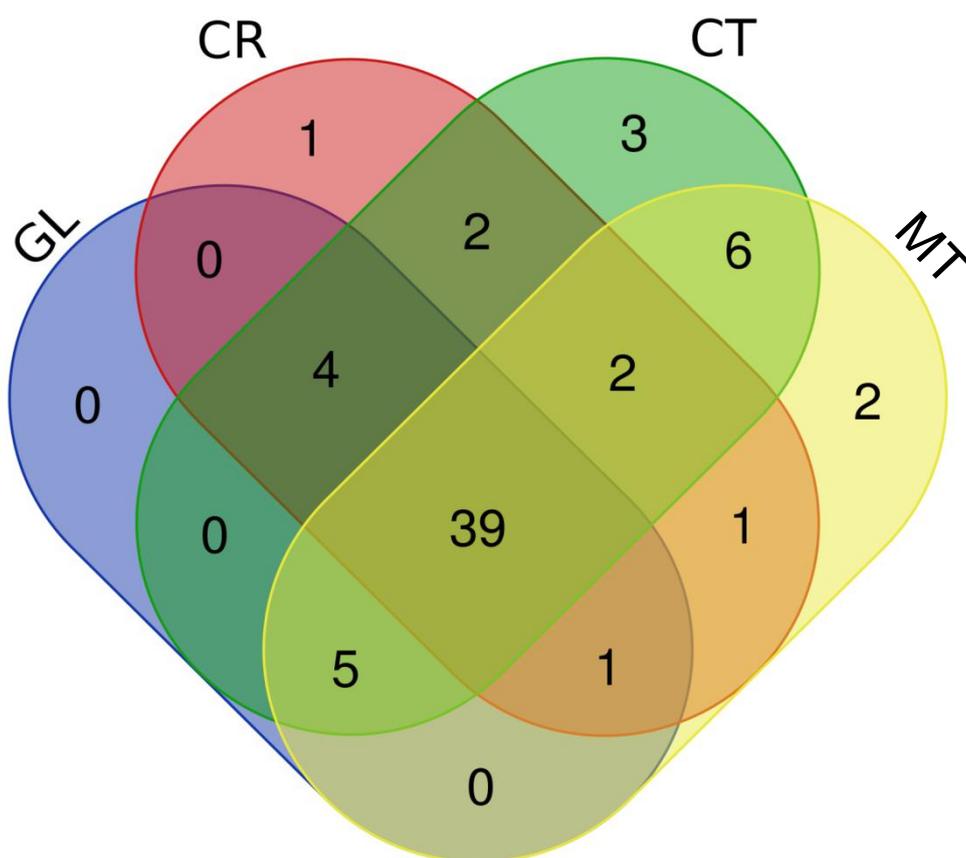


Figura 8: Diagrama de Venn demonstrando a distribuição dos 66 miRNAs conhecidos, expressos nos estádios globular (GL), coração (CR), cotiledonar (CT) e maduro (MT).

Tabela 2: Listagem dos 39 miRNAs conhecidos comuns a todos os estádios.

miRNAs	Sequências
miR1507	TCTCATTCCATACATCGTCTGA
miR1508	TAGAAAGGGAAATAGCAGTTG
miR1509	TTAATCAAGGAAATCACGGTCCG
miR1510	AGGGATAGGTAAAACAATGAC
miR1511	AACCAGGCTCTGATACCA
miR1512	TAAGTGAACATTCTTAGAGCAT
miR1520	ATTGTCACGTGTCATGTTCTGATT
miR1531	ATATGGACGAAGAGATAGGTAA
miR156	TGACAGAAGAGAGTGAGCAC
miR159	TTTGGATTGAAGGGAGCTCTA
miR160	TGCCTGGCTCCCTGTATGCCA
miR162	GGAGGCAGCGGTTTCATCGATC
miR164	AGAAGCAGGGCACGTGCA
miR166	CGGACCAGGCTTCATTCCCC
miR167	TGAAGCTGCCAGCATGATCTT
miR168	TCGCTTGGTGCAGGTCGGGA
miR170	TATTGGCCTGGTTCCTCAGCA
miR171	TATTGGCCTGGTTCCTCAGCA
miR2109	GGAGGCGTAGATACTCACACC
miR2118	TTGCCGATTCCACCCATTCCCTA
miR2119	TCAAAGGGAGTTGTAGGGGAA
miR2218	TTGCCGATTCCACCCATTCCCTA
miR319	AGAGCTTCCTTCAGTCCACTC
miR3522	TGAGACCAAATGAGCAGCTGA
miR384	TTGGCATTCTGTCCACCTCC
miR390	AAGCTCAGGAGGGATAGCGCC
miR394	TTGGCATTCTGTCCACCTCC
miR396	TTCCACAGCTTTCTTGAAC
miR398	GTGTTCTCAGGTCGCCCTG
miR399	TGCCAAAGGAGATTTGCCAG
miR408	ATGCACTGCCTCTTCCCTGGC
miR4379	TAGAGTGTATACTGTGAGAGGCCT
miR482	TCTTCCCTACACCTCCCATACC
miR5037	CCTCAAAGGCTTCCACTACTG
miR5043	TGTCCCCTTCTCTGCACCACC
miR5671	TACCCGAATTTGCTTCCATGAT
miR5770	TTAGGACTATGGTTTGGACGA
miR8175	TCCCCGGCAACGGCGCCA
miR9749	TTAGCTTCTTTCACCTTTCCC

A partir dos valores de expressão normalizados obtidos no miRProf, foram construídos *heatmaps* para avaliar o perfil de expressão dos miRNAs conhecidos identificados nos quatro estádios da embriogênese (Figuras 9, 10, 11 e 12). Cada linha representa uma família de miRNA, enquanto as colunas correspondem a um compartimento da semente em um determinado estágio da embriogênese. Na figura 9, estão representados os níveis de expressão dos 49 miRNAs expressos em seis tecidos da semente no estágio globular. Os principais miRNAs que se destacaram por possuírem altos níveis de expressão foram: miR482, miR1507, miR166, miR159, miR408, miR390, miR1510, miR2118, miR2218. Com maior destaque, os miRNAs miR482, miR1507 e miR166 mantiveram um alto perfil de expressão em relação às outras famílias de miRNAs, em todos os compartimentos da semente contendo o embrião no estágio globular. Os tecidos que apresentaram miRNAs com níveis mais altos de expressão foram o integumento externo e o hilo. No estágio de coração (Figura 10), o miR166 novamente exibiu alta expressão em todos os tecidos. O miR482 e o miR1507 também mantiveram alta expressão, havendo uma pequena redução principalmente no tecido do suspensor. Os compartimentos endosperma, embrião propriamente dito e integumento externo exibiram maiores níveis de expressão de miRNAs. A alta expressão do miR166 também pode ser observada em todos os tecidos dos estádios cotiledonar (Figura 11) e maduro (Figura 12). No estágio cotiledonar, os miRNAs miR1510, miR398 e miR319 mostraram-se mais expressos do que nos estádios anteriores. Os tecidos que exibiram níveis mais altos de miRNAs expressos foram o hilo, o integumento externo e a epiderme. Os miRNAs miR1510, miR1507, miR482, miR167 e miR166 apresentaram perfis de expressão muito semelhantes nesses três tecidos (Figura 11). Na semente contendo embrião no estágio maduro, o hilo foi o compartimento que mostrou miRNAs com níveis mais altos de expressão. Tanto no estágio maduro, quanto nos demais estádios, o miR3522 possuiu um perfil de expressão semelhante ao miR398 (Figura 12).

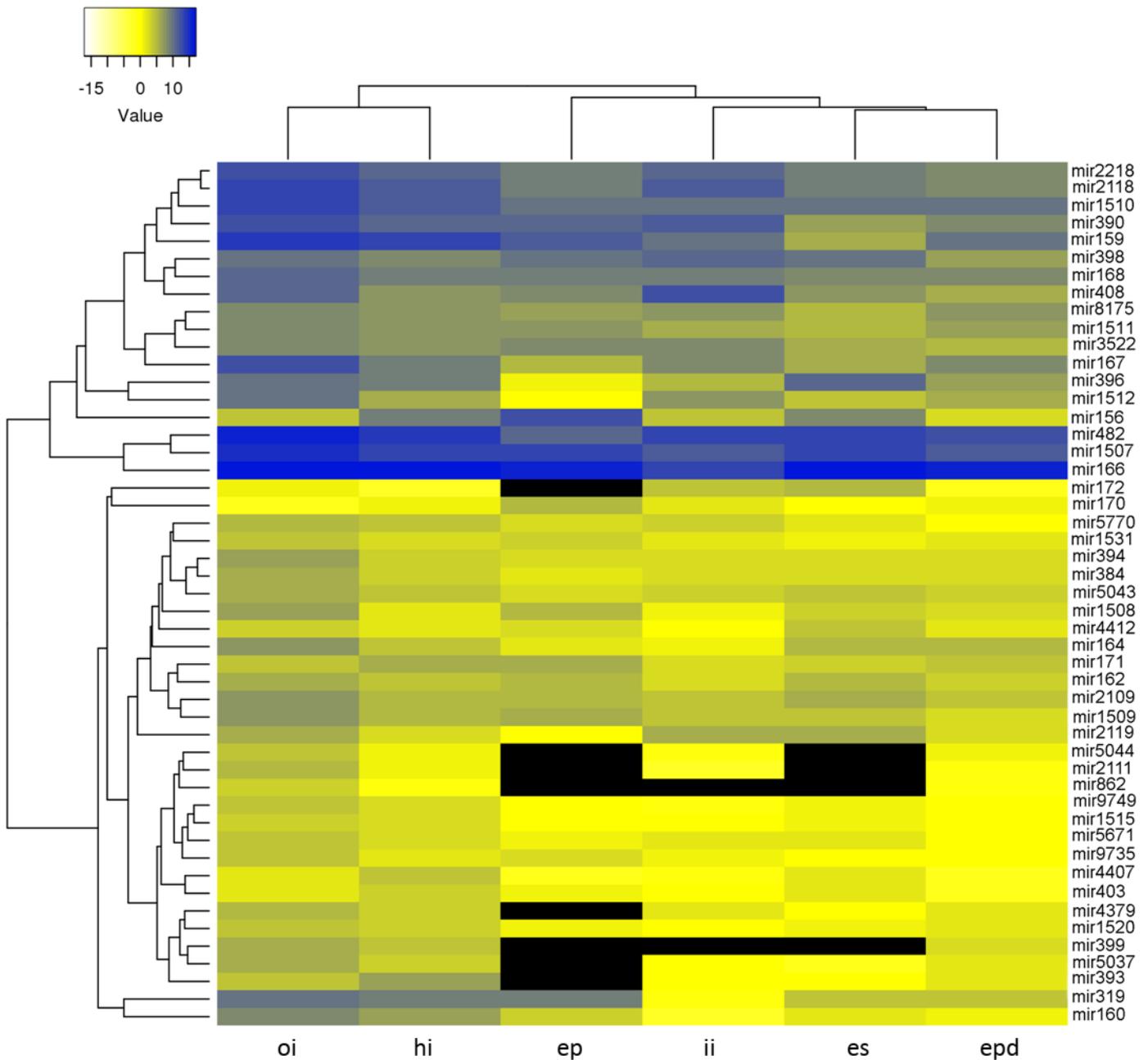


Figura 9: *Heatmap* gerado a partir dos valores de expressão normalizados dos 49 miRNAs identificados no estágio globular (linhas). Cada coluna corresponde a um compartimento da semente (oi: integumento externo; hi: hilo; ep: embrião propriamente dito; ii: integumento interno; es: endosperma; epd: epiderme). Os níveis de expressão dos miRNAs convertidos em \log_2 estão representados nas cores branco, amarelo ou azul, que correspondem a baixa, moderada ou alta expressão, respectivamente. Os miRNAs ausentes estão representados em preto.

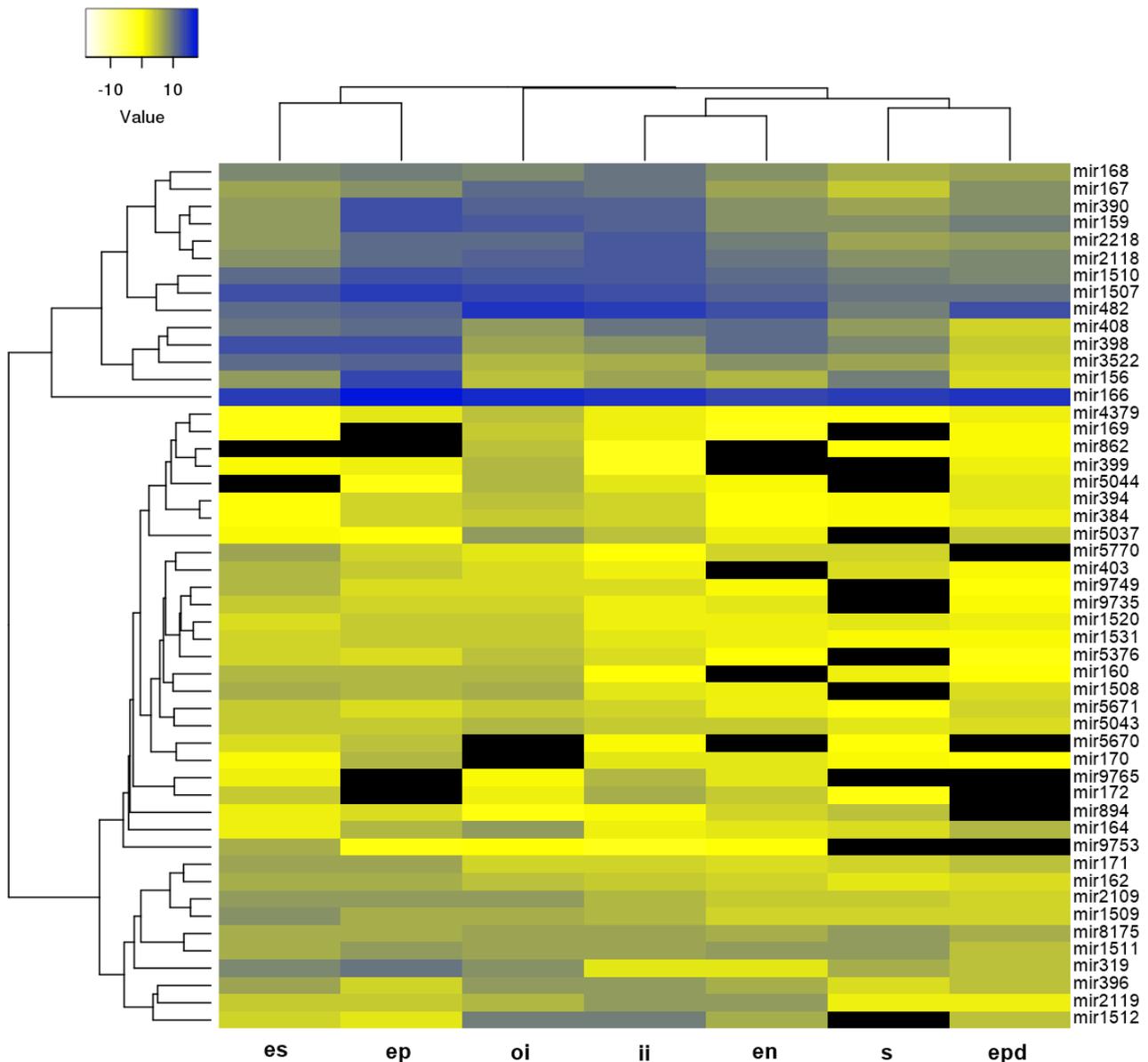


Figura 10: *Heatmap* gerado a partir dos valores de expressão normalizados dos 50 miRNAs identificados no estágio de coração (linhas). Cada coluna corresponde a um compartimento da semente (es: endosperma; ep: embrião propriamente dito; oi: integumento externo; ii: integumento interno; en: endotélio; s: suspensor; epd: epiderme). Os níveis de expressão dos miRNAs convertidos em \log_2 estão representados nas cores branco, amarelo ou azul, que correspondem a baixa, moderada ou alta expressão, respectivamente. Os miRNAs ausentes estão representados em preto.

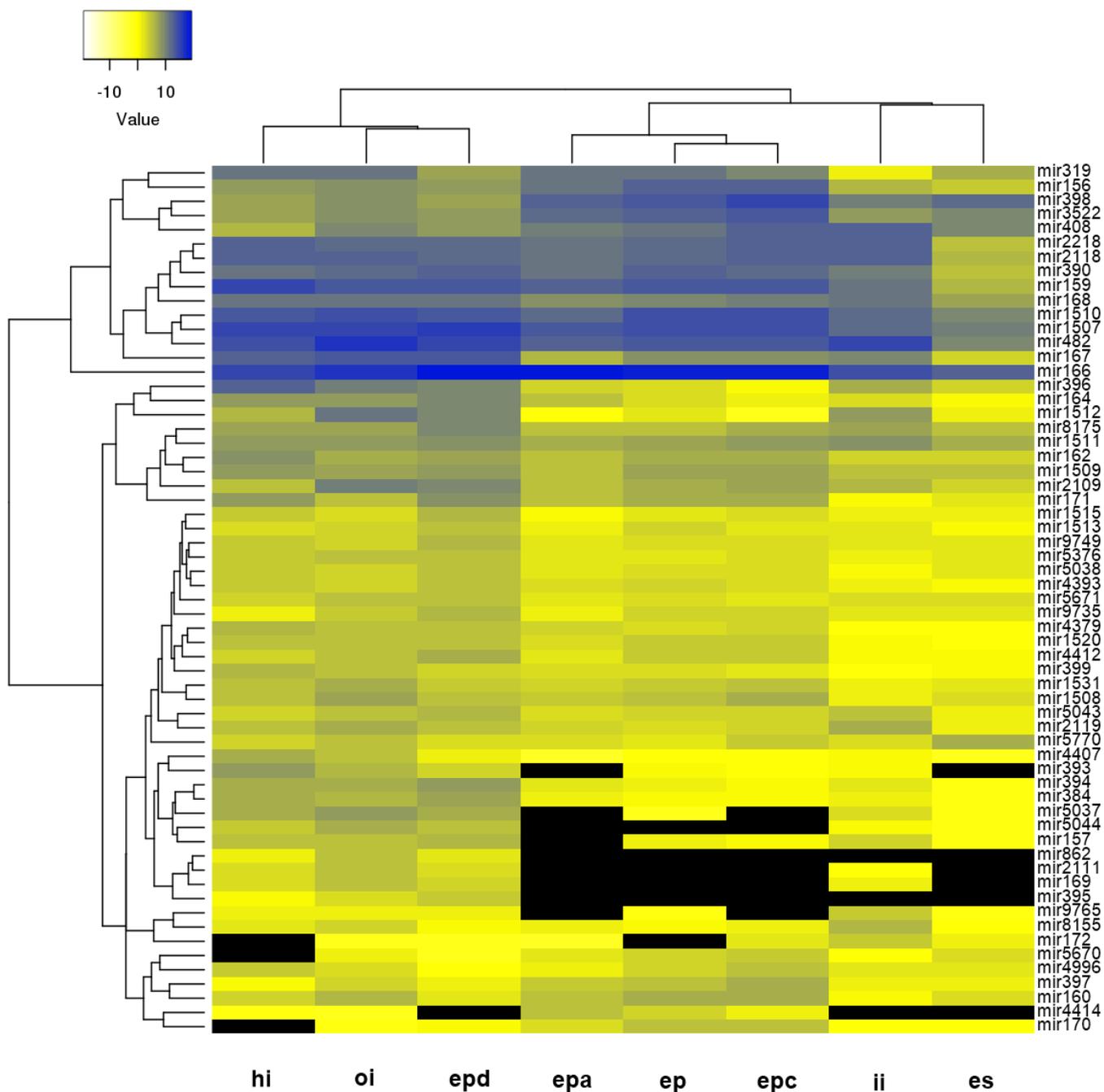


Figura 11: *Heatmap* gerado a partir dos valores de expressão normalizados dos 61 miRNAs identificados no estágio cotiledonar (linhas). Cada coluna corresponde a um compartimento da semente (hi: hilo; oi: integumento externo; epd: epiderme; epa: eixo do embrião; ep: embrião propriamente dito; epc: região cotiledonar do embrião; ii: integumento interno; es: endosperma). Os níveis de expressão dos miRNAs convertidos em log2 estão representados nas cores branco, amarelo ou azul, que correspondem à baixa, moderada ou alta expressão, respectivamente. Os miRNAs ausentes estão representados em preto.

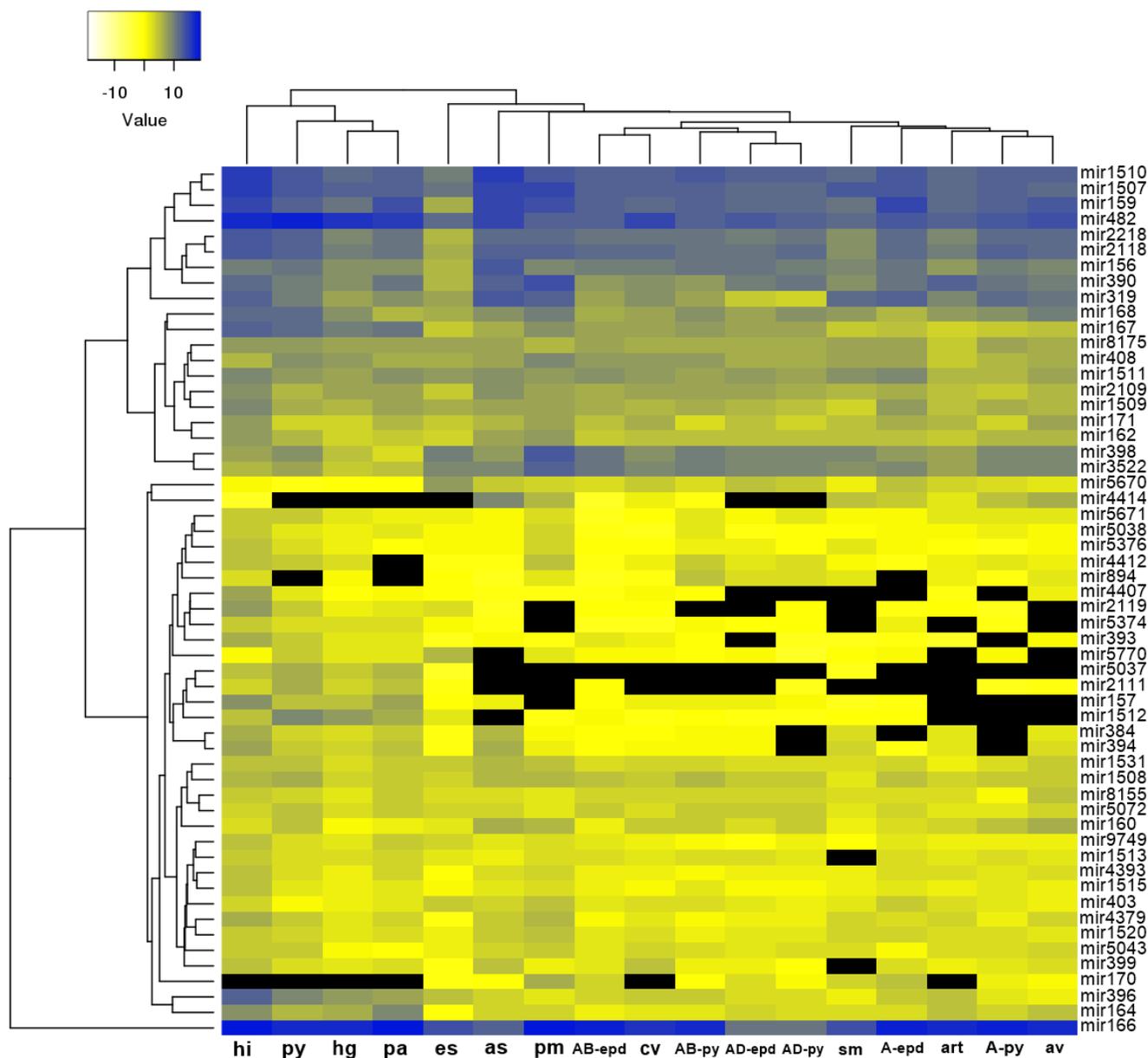


Figura 12: *Heatmap* gerado a partir dos valores de expressão normalizados dos 56 miRNAs identificados no estágio maduro (linhas). Cada coluna corresponde a um compartimento da semente (hi: hilo; py: parênquima do tegumento; hg: *hourglass*; pa: camada paliádica do tegumento; es: endosperma; as: estelo do eixo; pm: plúmula; AB-epd: epiderme abaxial do cotilédone; cv: feixe vascular do cotilédone; AB-py: parênquima abaxial do cotilédone; AD-epd: epiderme adaxial do cotilédone; AD-py: parênquima adaxial do cotilédone; sm: meristema apical da parte aérea; A-epd: epiderme do eixo; art: meristema apical da raiz; A-py: parênquima do eixo; av: feixe vascular do eixo). Os níveis de expressão dos miRNAs convertidos em log2 estão representados nas cores branco, amarelo ou azul, que correspondem à baixa, moderada ou alta expressão, respectivamente. Os miRNAs ausentes estão representados em preto.

A Figura 13 destaca os principais miRNAs conhecidos que apresentaram altos níveis de expressão em todos os estádios da embriogênese, e seus respectivos alvos, já relatados pela literatura. O miR398 tem como alvo os genes *Copper/Zinc Superoxide Dismutase* (CSD), envolvidos com o estresse oxidativo em plantas (GUAN et al., 2013). O miR390 regula transcritos *TAS3* (*TRANS-ACTING SIRNA3*), desencadeando a produção de tasiRNAs (XIA; XU; MEYERS, 2017). Já o miR166 tem como alvo a classe de genes *Homeodomain-Leucine Zipper III* (HD-ZIP III), envolvida em diferentes processos biológicos, como no desenvolvimento do meristema apical da raiz (SINGH et al., 2014). O miR159, muito conservado em plantas terrestres, regula genes MYB, os quais participam de uma gama de eventos biológicos, como a formação de flores, e também respondem a estresses ambientais (MILLAR; LOHE; WONG, 2019). Os miRNAs miR482, miR1507, miR1510 e miR2118 regulam genes de defesa *Nucleotide Binding Site–Leucine-Rich Repeat* (NBS-LRR), os quais atuam em interações com patógenos (ZHAI et al., 2011; ZHU et al., 2013).

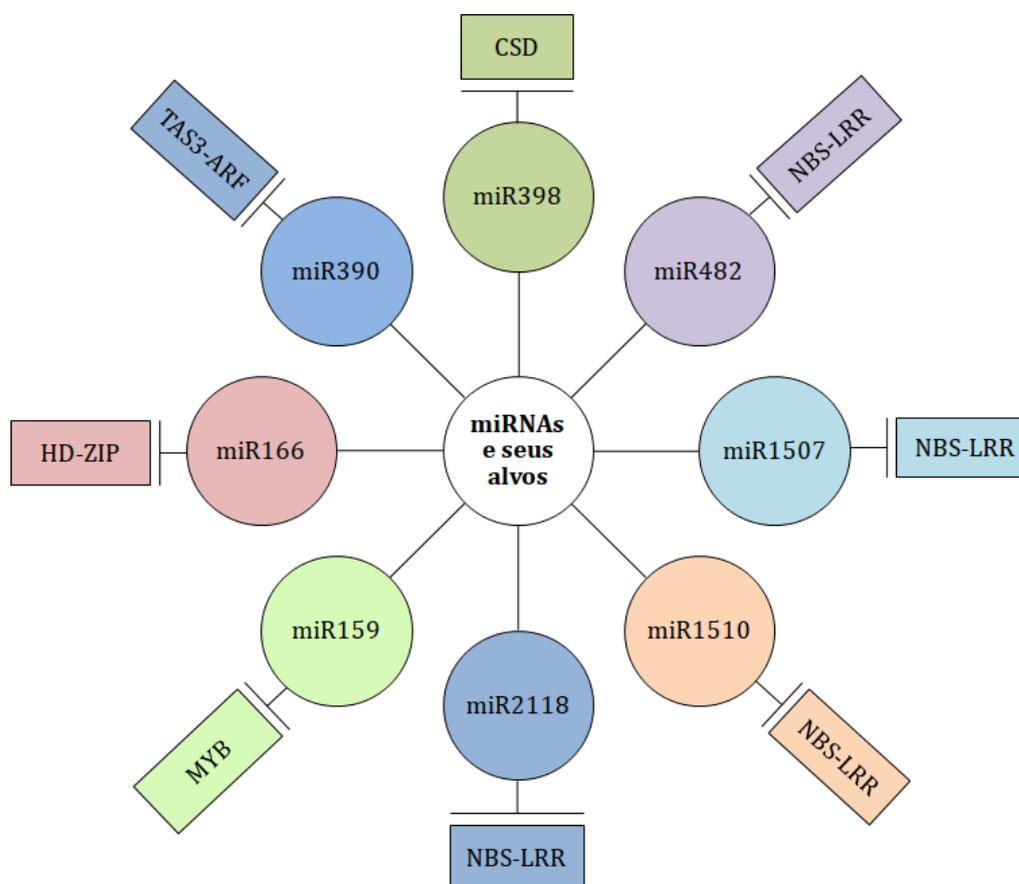


Figura 13: miRNAs conhecidos mais expressos durante os quatro estádios da embriogênese em *G. max* e seus respectivos alvos.

4.3. Análise de phasiRNAs

Levando em consideração os miRNAs miR390, miR172, miR2109, miR2118, miR1507, miR1509 e miR1515 que desencadeiam a produção de phasiRNAs, foi feita a busca no banco de dados construído no servidor MPSS, utilizando as sequências dos miRNAs obtidas no miRProf. Apenas no miR2118 foi detectada a presença de phasiRNAs, relacionados ao gene Glyma.20G121900 (Figura 14). A sequência da isoforma do miR2118 utilizada para a busca foi a “TTGCCGATTCCACCCATTCTTA”, de 22 nt. O miR2118 foi um dos miRNAs que apresentou alta expressão em todos os estádios da embriogênese avaliados nas figuras 9, 10, 11 e 12, sugerindo ser um importante regulador da expressão gênica durante a formação da semente de soja.



Figura 14: Resultado da busca por phasiRNAs gerados pelo miR2118. Cada ponto colorido representa um pequeno RNA, com a abundância indicada no eixo Y. Os pontos azul-claros representam sRNAs de 21 nt, verdes são sRNAs de 22 nt, laranja indicam sRNAs de 24 nt e cinza são sRNAs menores que 20 nt ou maiores que 25 nt. A faixa vermelha representa o éxon do gene Glyma.20G121900. A seta vermelha indica a fita na direção 5' – 3', e a seta azul indica a fita complementar 3' – 5'. Os pontos vermelhos possuem os *scores* mais altos dos sRNAs em fase encontrados (*score* igual a 32,4 na fita 5' – 3'; e *score* igual a 27,3 na fita 3' – 5').

4.4. Identificação de miRNAs novos e análise do perfil de expressão

As bibliotecas de pequenos RNAs inicialmente filtradas, foram submetidas ao programa miRCat2 a fim de identificar novos miRNAs envolvidos na embriogênese e maturação da semente de soja. Foram identificados 228 candidatos a novos miRNAs, listados na Tabela Suplementar S1. Após a identificação das sequências dos miRNAs novos, foi calculada a porcentagem de miRNAs com tamanho de 21 nt e 22 nt específicos de cada estágio da embriogênese (Figura 15). Em todos os estádios, ocorreu um padrão semelhante, sendo que os miRNAs de 22 nt apresentaram uma proporção maior do que os de miRNAs de 21 nt.

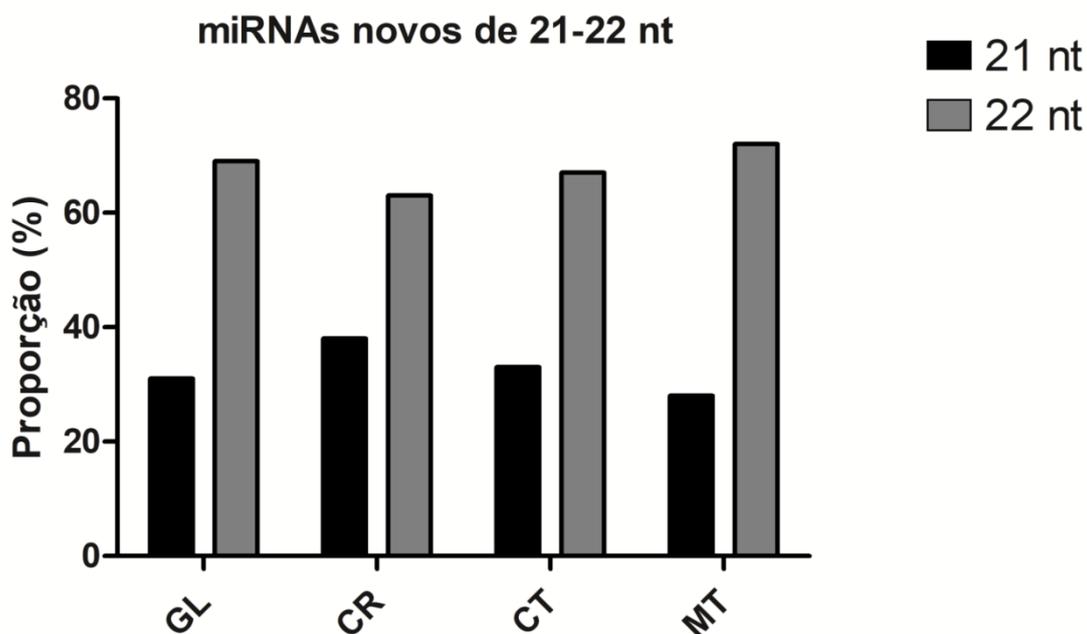


Figura 15: Proporção de miRNAs novos de 21 e 22 nt específicos dos estádios globular (GL), coração (CR), cotiledonar (CT) e maduro (MT).

Também foi calculada a proporção de sequências que se iniciam com A (adenina), U (uracila), C (citosina) ou G (guanina) em cada um dos estádios (Figura 16). Em todos os estádios a base nitrogenada que apresentou maior proporção no início das sequências foi a uracila, como já demonstrado em estudos anteriores (GOETTEL et al., 2014).

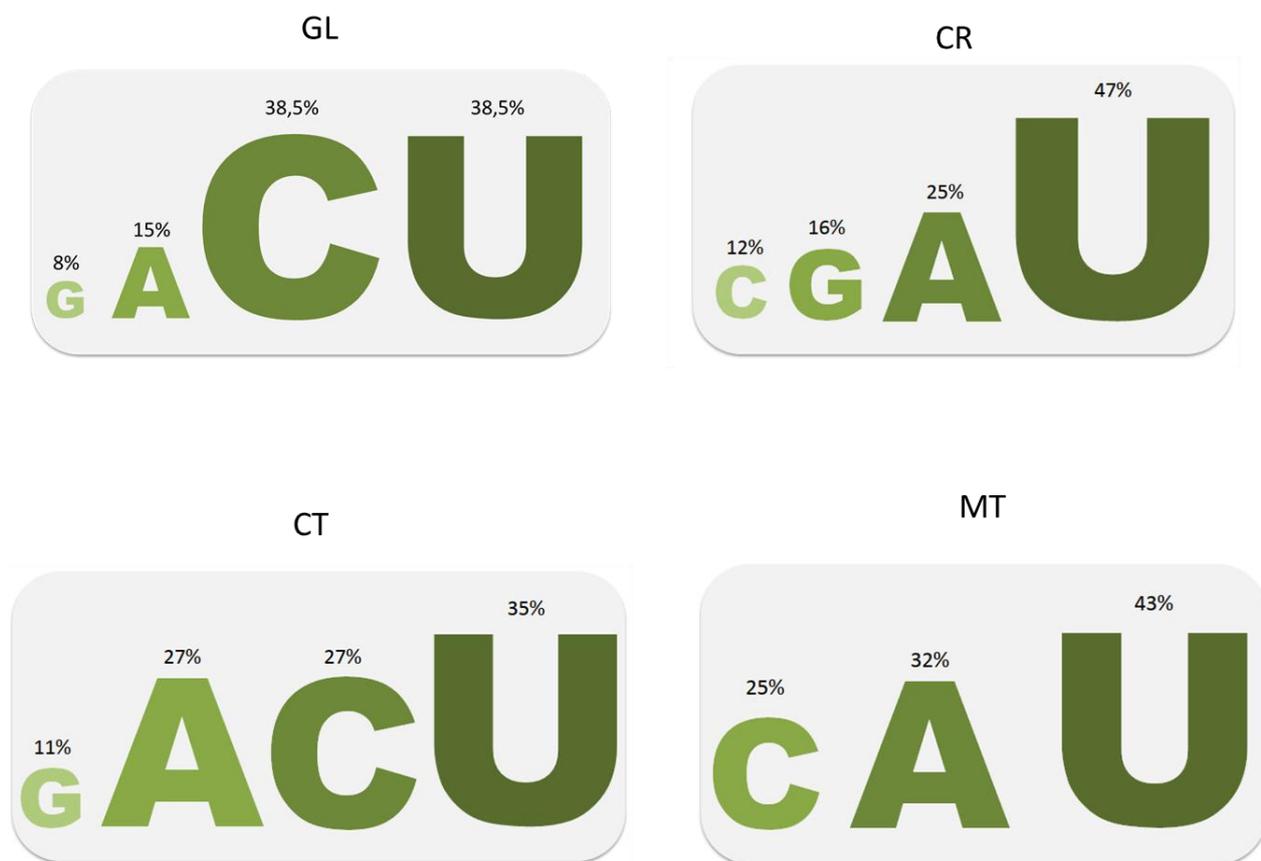


Figura 16: Porcentagem de A, U, C e G na primeira posição das sequências de candidatos a miRNAs específicos dos estádios globular (GL), coração (CR), cotiledonar (CT) e maduro (MT).

Foi realizada a construção de um diagrama de Venn, para avaliar quais miRNAs candidatos são expressos entre os diferentes estádios da semente (Figura 17). Do total de 228 miRNAs, apenas 11 foram comuns entre os estádios globular, coração, cotiledonar e maduro. O estádio globular apresentou 13 miRNAs específicos. Já o estádio de coração, possui 32 miRNAs exclusivos. O estádio cotiledonar foi o que exibiu maior quantidade de miRNAs específicos, com 60 miRNAs. E o estádio maduro apresentou 47 miRNAs únicos. Os estádios cotiledonar e maduro, com 27 miRNAs em comum, foram os que mais compartilharam miRNAs. Enquanto entre os estádios globular e coração, não houve nenhum miRNA em comum.

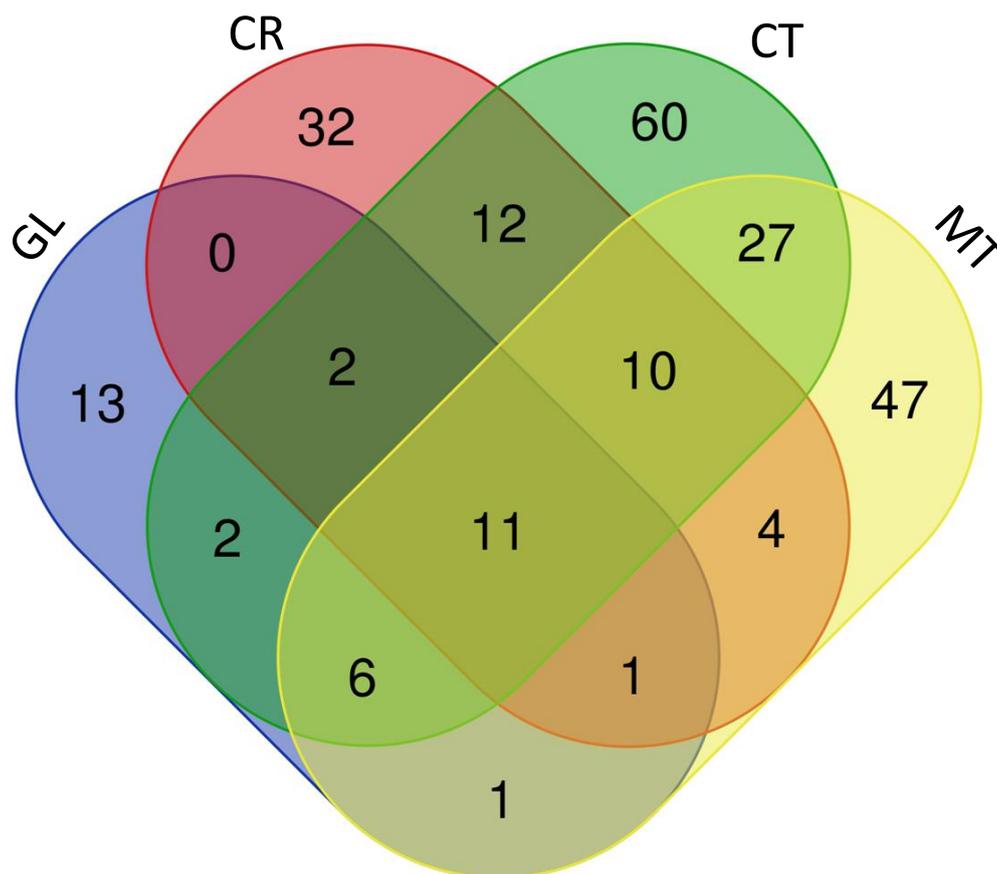


Figura 17: Diagrama de Venn demonstrando a distribuição dos 228 miRNAs novos presentes nos estádios globular (GL), coração (CR), cotiledonar (CT) e maduro (MT).

Após os valores de expressão dos candidatos a miRNAs serem normalizados em RPM, foram selecionadas as sequências com expressão acima de 15 RPM para a construção do *heatmap*. Os valores de expressão então convertidos em \log_2 são representados na Figura 18. Nove miRNAs foram expressos nos estádios globular, coração, cotiledonar e maduro. Os demais miRNAs exibiram expressão em estádios específicos, sendo dois miRNAs no estágio globular; dez miRNAs no estágio de coração; seis miRNAs no estágio cotiledonar; e dois miRNAs no estágio maduro. O miRNA denominado miRseq1 foi o que apresentou mais alta expressão em todos os estádios, seguido pelo miRseq3, miRseq5 e miRseq64. O estágio globular foi o que apresentou maior expressão do miRseq1.

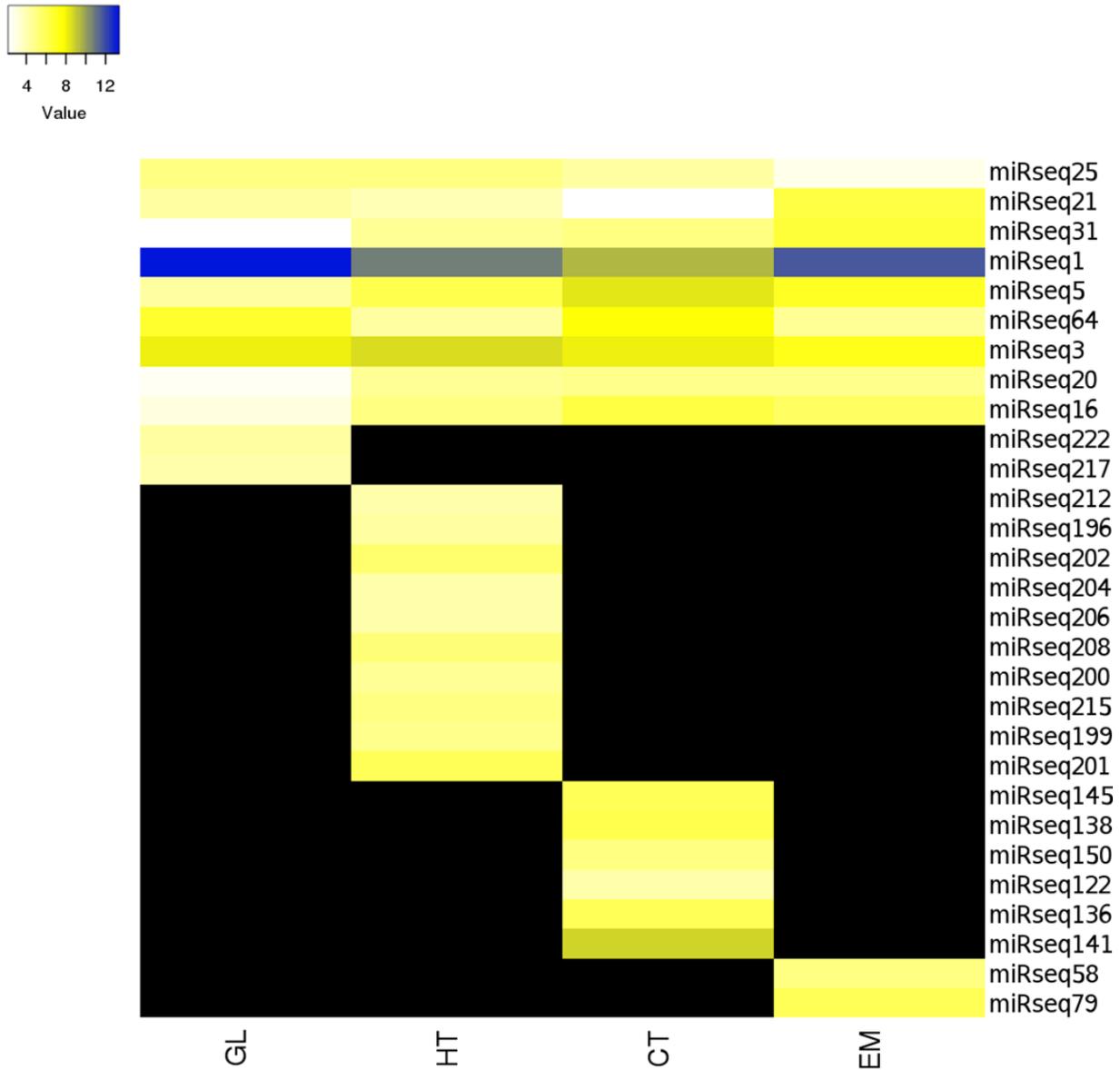


Figura 18: *Heatmap* gerado a partir dos valores de expressão normalizados dos miRNAs novos com expressão acima de 15 RPM. GL: estágio globular; HT: estágio de coração; CT: estágio cotiledonar; EM: estágio maduro. Os níveis de expressão dos miRNAs convertidos em \log_2 estão representados nas cores branco, amarelo ou azul, que correspondem à baixa, moderada ou alta expressão, respectivamente. Os miRNAs ausentes estão representados em preto.

4.5. Identificação dos alvos dos miRNAs novos

A análise realizada no psRNAtarget permitiu identificar os potenciais alvos dos miRNAs candidatos, bem como prever a forma de regulação do alvo, através da clivagem ou inibição da tradução (Tabela Suplementar S2). Dos 325 genes alvo listados, apenas oito tiveram a inibição da tradução como forma de regulação. O psRNAtarget fornece o valor esperado que indica o grau de similaridade entre o miRNA maduro e a sequência alvo. Quanto maior o valor esperado, menor a similaridade entre o miRNA e o alvo, pois representa os *mismatches* que ocorreram entre as duas sequências (DAI; ZHAO, 2011). O valor de corte máximo recomendado é de 3.0 a 5.0. Na Tabela Suplementar S2, são mostrados os potenciais alvos com valor esperado de até 2.0.

A partir do banco de dados Soybase, foi possível obter o nome e a anotação dos genes alvos. Um dos principais alvos listados é a família de fatores de transcrição ULTRAPETALA (ULT2), que atua durante a acumulação de células meristemáticas no meristema floral e da parte aérea (FLETCHER, 2001). Outros importantes possíveis alvos identificados foram os fatores de transcrição MYB, que atuam em diferentes processos biológicos, desde resposta a estresses bióticos e abióticos, a diferenciação e proliferação celular (AMBAWAT et al., 2013). Também foi identificada a família de genes NBS-LRR, importante para a resistência a doenças em plantas (MCHALE et al., 2016).

4.6. Teste da técnica FASTmiR

Foi feito um experimento para avaliar a viabilidade de utilização da técnica FASTmiR na identificação de miRNAs. Nesse experimento, foi analisada a intensidade de fluorescência gerada quando o fluoróforo DFHBI se ligou à sonda FASTmiR específica para o miRNA de interesse. A partir das imagens de fluorescência obtidas pelo microscópio de fluorescência, foi possível calcular e comparar a intensidade de fluorescência das três amostras. Como se pode observar na Figura 19, a intensidade de fluorescência na amostra DFHBI + Sonda foi maior do que nas amostras DFHBI + Água e Sonda + Água.

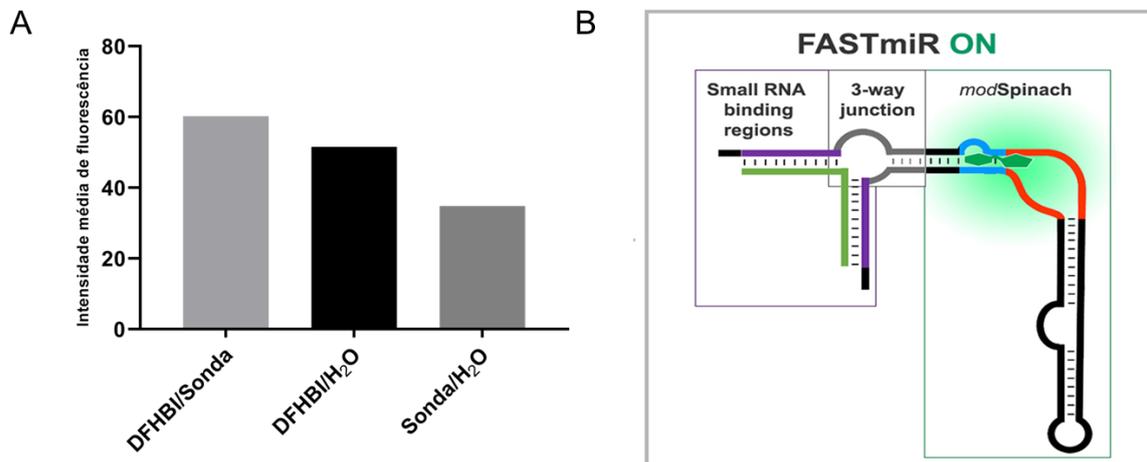


Figura 19: Gráfico gerado a partir dos valores de intensidade média de fluorescência das amostras DFHBI + Sonda; DFHBI + Água; e Sonda + Água (A). Representação da sonda FASTmiR (*modSpinach*) ativada, ao se ligar ao fluoróforo DFHBI, representado em verde (B) (Adaptado de HUANG et al. (2017)).

5. DISCUSSÃO

Desde o primeiro relato dos miRNAs em *Arabidopsis*, no ano de 2002, milhares de famílias miRNAs foram identificadas em plantas no decorrer dos anos, conforme os registros disponíveis no banco de dados miRBase (KOZOMARA; BIRGAOANU; GRIFFITHS-JONES, 2019). Esses pequenos RNAs estão envolvidos em diversas vias de sinalização, regulando proteínas e fatores de transcrição, como os ARFs, cruciais para a manutenção do sinal de auxina durante o desenvolvimento da semente (DAS et al., 2015). Diferentes investigações relataram que miRNAs desempenham papel crítico durante o desenvolvimento de sementes, podendo atuar em tecidos e estádios específicos. Tanto em mutantes exibindo fatores de transcrição resistentes aos miRNAs, quanto em mutantes defectivos para enzimas envolvidas na biogênese dos miRNAs, como a DCL1, houve anormalidade embrionária e formação de tegumentos defeituosos (WILLMANN et al., 2011; BEWLEY et al., 2013; ARMENTA-MEDINA et al., 2017). Considerando que o desenvolvimento correto da semente é determinante para a viabilidade dos grãos, compreender as redes regulatórias embriogênicas que os miRNAs participam pode auxiliar na investigação de estratégias biotecnológicas para incrementar a produtividade e qualidade de sementes de grande valor agrônômico, como a soja (DJAMI-TCHATCHOU et al., 2017; SORKHEH; RAJABPOOR, 2017). Apesar do importante papel dos miRNAs na formação de sementes, os dados disponíveis na literatura sobre os perfis de expressão de miRNAs durante o desenvolvimento de sementes de soja ainda são escassos.

Os avanços na área de bioinformática permitiram o desenvolvimento de técnicas cada vez mais eficazes para a identificação de miRNAs e predição de seus alvos (CHEN et al., 2019). Neste trabalho, analisamos o perfil de expressão de miRNAs canônicos e candidatos a novos miRNAs durante os estádios da embriogênese de sementes de soja, e também realizamos a predição dos potenciais genes alvos, por meio de abordagens computacionais.

A partir dos valores dos *reads* totais e filtrados de cada estádio da embriogênese, listados nas Tabelas 1, foi possível observar picos de sRNAs com 21 nt e 24 nt nos *reads* não redundantes, tanto quando avaliados em todos os estádios (Figura 7A), como quando analisados separadamente por

estádio (Figuras 7B–E). Esse padrão de enriquecimento de sRNAs com 21 nt e 24 nt já foi observado em um estudo feito para a caracterização de sRNAs em cotilédones de soja, sendo que a proporção dos sRNAs com 24 nt também se apresentou maior em relação aos sRNAs de 21 nt (GOETTEL et al., 2014). Assim como observado nos gráficos referentes aos *reads* não redundantes, Joshi e colaboradores (2010) demonstraram que a abundância de sequências de 24 nt é muito superior às sequências de 18 a 30 nt, em raízes, nódulos, flores e sementes de soja, sendo que o maior pico de sRNAs com 24 nt ocorreu nas bibliotecas de sementes com 20 dias pós-floração (JOSHI et al., 2010). Em diversas espécies de angiospermas, os sRNAs de 24 nt se apresentam como os mais abundantes em bibliotecas de sRNAs obtidas por sequenciamento. Isso possivelmente se deve à presença de siRNAs de 24 nt como hc-siRNAs, nat-siRNAs e/ou phasiRNAs (AXTELL, 2013).

A identificação de miRNAs conhecidos nas bibliotecas de sRNAs exibiu 66 miRNAs com expressão acima de 15 RPM nos quatro estádios da embriogênese (Figura 8), sendo que 39 miRNAs foram comuns a todos os estádios (Tabela 2). A presença de múltiplos miRNAs nos quatro estádios da embriogênese, e nos diferentes tecidos da semente, demonstra que os processos que ocorrem durante a formação da semente requerem a regulação de miRNAs canônicos em diferentes níveis. Os miRNAs únicos encontrados nos estádios coração, cotiledonar e maduro sugerem a ação estágio-específica desses miRNAs. No estágio de coração, o miRNA miR9753 identificado não possui dados conclusivos na literatura científica sobre os genes-alvo e função biológica. Foram encontrados três miRNAs específicos no estágio cotiledonar: miR395, miR397 e miR4996. O miR395 está envolvido com a regulação da germinação sob estresse hídrico e salino, regulando a expressão da proteína ATP sulfúrilase (APS) e do transportador de sulfato SULTR2 em *Arabidopsis* (KIM et al., 2010). O miR397 está relacionado com a regulação da enzima lacase, a qual age na lignificação da parede celular (DE LUIS et al., 2012). A modulação da lacase pelo miR397 é importante para o controle do tamanho e número de sementes geradas em *Arabidopsis* (WANG et al., 2014). Já o miR4996 participa da formação do meristema apical da parte aérea e da formação de folhas em soja (WONG et al., 2011). No estágio maduro, o miR5374 tem como alvos os genes de defesa NBS-LRR em soja (YIN et al.,

2013). E o miR5072 tem um importante papel na resposta ao estresse térmico em *O. sativa* (MANGRAUTHIA et al., 2017).

Nas Figuras 9 – 12 foi possível analisar os diferentes perfis de expressão dos miRNAs canônicos ao longo dos estádios da embriogênese. Algumas famílias de miRNAs como miR482, miR1507, miR1510, miR166, miR398, miR390, miR159, miR2118 apresentaram altos níveis de expressão ao longo dos estádios da embriogênese (Figura 13). No entanto, outras famílias de miRNAs exibiram expressão característica em tecidos e estádios específicos. Por exemplo, o miR156 é mais expresso no tecido correspondente ao embrião propriamente dito (ep) no estágio globular (Figura 9), o que condiz com seu papel desempenhado durante a formação do padrão embrionário correto, a partir do embrião com oito células (NODINE; BARTEL, 2010; ARMENTA-MEDINA et al., 2017). O miR156 também é importante para a maturação do embrião, e permanece expresso no compartimento do embrião propriamente dito (ep) também nos estádios do coração (Figura 10) e cotiledonar (Figura 11). Um outro padrão de expressão interessante foi apresentado pelos miR159 e miR319. Essas duas famílias compartilham genes-alvo em comum, como os fatores de transcrição MYB33 e MYB65 (GOETTEL et al., 2014). Esse fato pode estar relacionado com os níveis de expressão semelhantes apresentados pelos miR159 e miR319 durante os estádios: no estágio globular, ambos miRNAs exibiram maior expressão nos compartimentos integumento externo (oi), hilo (hi) e embrião propriamente dito (ep) (Figura 9); no estágio de coração, foram mais expressos no tecido do embrião propriamente dito (ep) (Figura 10); no estágio cotiledonar, apresentaram expressão mais alta nos compartimentos eixo do embrião (epa), embrião propriamente dito (ep) e região cotiledonar do embrião (epc) (Figura 11); e no estágio maduro, foram mais expressos nos compartimentos estelo do eixo (as), plúmula (pm) e epiderme do eixo (A-epd) (Figura 12). Assim como as famílias miR159 e miR319, os miRNAs miR398 e miR3522 mostraram padrões de expressão muito similares entre si em todos os estádios (Figuras 9 – 12). O miR398 é um importante regulador da homeostase de cobre, auxiliando a planta durante o estresse oxidativo (NAYA et al., 2014). O miR3522 já foi relatado como abundante em tecidos da semente de soja (ARIKIT et al., 2014), e está envolvido na sinalização de fosfato (XU et al., 2013). Tanto o miR398, quanto o miR3522 estão

relacionados com respostas a estresses ambientais em soja, como déficit hídrico (ZHENG et al., 2016). Os perfis de expressão semelhantes desses miRNAs sugere que ambos participam de redes regulatórias semelhantes durante o desenvolvimento de sementes de soja. Um outro miRNA que também demonstrou expressão nos estádios globular e de coração foi o miR167 (Figuras 9 e 10), que regula os fatores de resposta a auxina ARF6 e ARF8. Considerando que a auxina é responsável pela formação da bilateridade do embrião durante a transição do estágio globular para o coração (GOLDBERG; DE PAIVA; YADEGARI, 1994), o miR167 pode ser fundamental para regular os níveis de auxina durante esse processo.

Visivelmente, o miR166 foi o miRNA que mais se destacou, mantendo alta expressão em todos os compartimentos da semente, durante todos os estádios (Figuras 9 – 12). O miR166 é uma das famílias de miRNAs mais antigas, e está presente em quase todos os grupos das embriófitas (plantas terrestres) (GOETTEL et al., 2014). A modulação de fatores de transcrição HD-ZIP III pelo miR166 é crucial para a formação dos meristemas apical da raiz e da parte aérea na embriogênese, sendo determinante para a formação da polaridade adequada (MIYASHIMA et al., 2013). Além disso, participa do desenvolvimento dos cotilédones e da maturação do embrião (ARMENTA-MEDINA et al., 2017). A atuação do miR166 em diferentes redes de regulação durante a formação da semente pode explicar sua alta expressão constante durante os quatro estádios. Na figura 13, também é possível observar que, dos oito miRNAs mais expressos entre os estádios, quatro regulam os genes de resistência a doenças NBS-LRR. Isso indica que os miRNAs participam da regulação de genes chave envolvidos com a resposta a patógenos durante a embriogênese. Além disso, Zhai e colaboradores (2011) demonstraram que miRNAs que possuem como alvos os genes NBS-LRR podem desencadear a produção de phasiRNAs (ZHAI et al., 2011). Outro dado importante é que todas as famílias de miRNAs representadas na figura 13 foram relatadas em cotilédones de soja por GOETTEL et al. (2014). A alta expressão dessas famílias de miRNAs no estágio cotiledonar também pode ser observada na Figura 11.

A Figura 14 revelou sRNAs em fase produzidos pelo miR2118 de 22 nt. As características do miR2118 condizem com o descrito por Zhai e

colaboradores (2011), de que miRNAs que desencadeiam a produção de phasiRNAs em leguminosas também regulam genes de defesa NBS-LRR. Além disso, os miRNAs que produzem phasiRNAs possuem o tamanho característico de 22 nt (ZHAI et al., 2011), como o miRNA2118 utilizado na busca.

Neste trabalho, também foram identificados 228 candidatos a novos miRNAs (Tabela Suplementar S1). A porcentagem de miRNAs candidatos de 21 e 22 nt demonstrada na Figura 15 revelou que os miRNAs de 22 nt são os mais proeminentes em todos os estádios da embriogênese, com uma média de 67,5% em relação aos miRNAs de 21 nt, com 32,5%. Essa observação é condizente com o observado por Zhai e colaboradores (2011), de que os miRNAs de 22 nt são os mais numerosos e expressos em espécies de leguminosas (ZHAI et al., 2011). Também foi calculada a porcentagem de A, U, C e G nas extremidades 5' das sequências dos potenciais miRNAs novos específicos de cada estágio (Figura 16). Houve uma maior proporção de bases U em relação a A, C e G, com exceção do estágio globular, onde a porcentagem de U foi a mesma observada para C. A maior proporção de bases U na extremidade 5' é considerada uma característica crucial para a identificação de miRNAs (LAU et al., 2001). Em *Arabidopsis*, foi visto que a AGO1 tem maior afinidade por miRNAs que se iniciam com U (MI et al., 2008). Além disso, em soja já foi observada anteriormente a maior abundância de miRNAs identificados contendo uracila na primeira posição (GOETTEL et al., 2014).

Ao comparar o diagrama de Venn que demonstra a distribuição dos miRNAs novos entre os estádios da embriogênese (Figura 17), com o diagrama de Venn referente aos miRNAs conhecidos (Figura 8), é possível perceber que os miRNAs novos apresentam poucos miRNAs comuns entre estádios, e maior quantidade de miRNAs específicos por estágio do que os miRNAs conhecidos. Esse padrão também foi observado por Bai et al. (2017) em sRNAs conhecidos e novos expressos em embriões de *Hordeum vulgare* L. (cevada) durante a maturação e germinação da semente (BAI et al., 2017). Isso indica que os miRNAs novos possuem maior atuação tecido e/ou estágio-específica do que os miRNAs canônicos e conservados. Dos 29 miRNAs candidatos com expressão acima de 15 RPM representados no *heatmap* da Figura 18, apenas

nove apresentaram expressão em todos os estádios. Isso reforça a possível especificidade na regulação feita pelos miRNAs não-canônicos durante as fases de formação da semente.

Dos alvos dos miRNAs novos preditos (Tabela Suplementar S2), a grande parte apresentou a clivagem como forma de regulação, o que corrobora com o fato de que a clivagem do alvo é a principal forma de regulação realizada por miRNAs em plantas (KIDNER; MARTIENSSEN, 2005). A partir dos genes alvos identificados, foram observados possíveis alvos comuns de regulação por miRNAs, como MYB, NBS-LRR, SPL e fatores de transcrição com domínio NAC, os quais são fundamentais para o desenvolvimento do correto do embrião (MALLORY et al., 2004).

O experimento realizado para testar a viabilidade de aplicação da técnica FASTmiR na identificação de miRNAs mostrou que o fluoróforo DFHBI exibe maior intensidade de fluorescência ao se ligar à sonda FASTmiR específica para o miRNA (Figura 19), como demonstrado por Huang e colaboradores (2017). A técnica FASTmiR, que pode ser adaptada para qualquer pequeno RNA, se apresentou como um potencial método para a quantificação dos níveis de miRNAs *in vitro* ou *in vivo*.

Diante do exposto, os resultados apresentados podem ampliar o conhecimento sobre a atuação dos miRNAs na formação de sementes de soja, e podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas, visando incrementar a qualidade de sementes de soja.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, podemos concluir que:

- Na análise das bibliotecas de pequenos RNAs geradas por sequenciamento de nova geração, os sRNAs com comprimento de 24 nt são os mais abundantes, e possivelmente são correspondentes a classes de siRNAs.
- Dos 66 miRNAs conhecidos envolvidos com a regulação da embriogênese, 39 foram comuns a todos os estádios. As famílias de miRNAs que apresentaram níveis mais altos de expressão ocorreram em todas as fases da embriogênese. Isso demonstra que miRNAs canônicos participam de vias regulatórias importantes em todos os estádios da embriogênese da semente de soja.
- PhasiRNAs foram gerados pelo miR2118, um miRNA de 22 nt, que regula genes de defesa NBS-LRR, e que exibiu alta expressão nos quatro estádios da embriogênese.
- Dos 228 candidatos a novos miRNAs identificados, apenas 11 ocorreram em todos os estádios da embriogênese, e a maior parte desses miRNAs foi exclusiva dos estádios globular, coração, cotiledonar ou maduro, indicando que os miRNAs novos possuem regulação específica por estádio.
- A maioria dos candidatos a miRNAs apresentou 22 nt de comprimento e a uracila na primeira posição das sequências, na extremidade 5'.
- Os possíveis alvos identificados mostraram genes comumente regulados por miRNAs conhecidos na embriogênese, como fatores de transcrição MYB, SPL e genes NBS-LRR. A maior parte dos alvos identificados apresentou a clivagem como mecanismo de ação dos miRNAs.
- A técnica FASTmiR representa uma potencial estratégia para a identificação experimental de miRNAs.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, R. S. et al. Genetic analysis reveals functional redundancy and the major target genes of the Arabidopsis miR159 family. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 41, p. 16371–16376, 2007.

AMBAWAT, S. et al. MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: An overview. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 19, n. 3, p. 307–321, 2013.

ANGRAND, P. O. et al. The role of long non-coding RNAs in genome formatting and expression. **Frontiers in Genetics**, v. 6, p. 165, 2015.

ARIKIT, S. et al. An atlas of soybean small RNAs identifies phased siRNAs from hundreds of coding genes. **Plant Cell**, v. 26, n. 12, p. 4584–4601, 2014.

ARMENTA-MEDINA, A. et al. Arabidopsis thaliana miRNAs promote embryo pattern formation beginning in the zygote. **Developmental Biology**, v. 431, n. 2, p. 145–151, 2017.

ARMENTA-MEDINA, A.; GILLMOR, C. S. (2019) An introduction to methods for discovery and functional analysis of MicroRNAs in plants. In: DE FOLTER, S. (Ed.). **Plant miRNAs. Methods in Molecular Biology**. New York, NY: Humana Press, p. 1–14.

AXTELL, M. J. Classification and Comparison of Small RNAs from Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, n. 1, p. 137–159, 2013.

AXTELL, M. J.; MEYERS, B. C. Revisiting criteria for plant microRNA annotation in the Era of big data. **Plant Cell**, v. 30, n. 2, p. 272–284, 2018.

BABICKI, S. et al. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. **Nucleic acids research**, v. 44, n. W1, p. W147–W153, 2016.

BACHELLERIE, J. P.; CAVAILLÉ, J.; HÜTTENHOFER, A. The expanding snoRNA world. **Biochimie**, v. 84, n. 8, p. 775–790, 2002.

BAI, B. et al. microRNAs participate in gene expression regulation and phytohormone cross-talk in barley embryo during seed development and germination. **BMC Plant Biology**, v. 17, n. 150, 2017.

BALDRICH, P. et al. Plant extracellular vesicles contain diverse small RNA species and are enriched in 10- to 17-nucleotide “Tiny” RNAs. **Plant Cell**, v. 31, n. 2, p. 315–324, 2019.

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

BEREZIKOV, E.; CUPPEN, E.; PLASTERK, R. H. A. Approaches to microRNA discovery. **Nature Genetics**, v. 38, n. 6S, p. S2, 2006.

BERTRAND E.; FOURNIER, M. J. (2013) The snoRNPs and Related Machines: Ancient Devices That Mediate Maturation of rRNA and Other RNAs. In: **Madame Curie Bioscience Database**. Austin, TX: Landes Bioscience.

BEWLEY, J. D. et al. **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy**. – 3.ed. – New York: Springer Science & Business Media, 2013. 392 p.

BONATO, E. R.; BONATO, A. L. V. **A soja no Brasil: história e estatística**. Londrina: EMBRAPA, CNPSo, 1987. 61 p.

BORGES, F.; MARTIENSSEN, R. A. The expanding world of small RNAs in plants. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 12, p. 727–741, 2015.

BORSANI, O. et al. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. **Cell**, v. 123, n. 7, p. 1279–1291, 2005.

BRANNAN, C. I. et al. The product of the H19 gene may function as an RNA. **Molecular and Cellular Biology**, v. 10, n. 1, p. 28–36, 1990.

CÂMARA, G. M. S. **Soja: tecnologia de produção**. Piracicaba: Esalq, 1998. 293 p.

CECH, T. R.; STEITZ, J. A. The noncoding RNA revolution - Trashing old rules to forge new ones. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 77–94, 2014.

CHAN, P. P.; LOWE, T. M. GtRNADB: A database of transfer RNA genes detected in genomic sequence. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. D93–D97, 2009.

CHEN, L. et al. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 5, p. 1836–1852, 2019.

CHRISTENHUSZ, M. J. M.; BYNG, J. W. The number of known plants species in the world and its annual increase. **Phytotaxa**, v. 261, n. 3, p. 201–217, 2016.

CREASEY, K. M. et al. MiRNAs trigger widespread epigenetically activated siRNAs from transposons in Arabidopsis. **Nature**, v. 508, n. 7496, p. 411–415, 2014.

CRICK, F. Central dogma of molecular biology. **Nature**, v. 227, n. 5258, p. 561–563, 1970.

CURABA, J.; SINGH, M. B.; BHALLA, P. L. MiRNAs in the crosstalk between phytohormone signalling pathways. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 6, p. 1425–1438, 2014.

DAI, X.; ZHAO, P. X. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. **Nucleic Acids Res**, v. 39, p. W155–W159, 2011.

DAS, S. S. et al. Small RNA mediated regulation of seed germination. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 2015.

DE LUIS, A. et al. Two microRNAs linked to nodule infection and nitrogen-fixing ability in the legume *Lotus japonicus*. **Plant Physiology**, v. 160, n. 4, p. 2137–2154, 2012.

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, 2017.

DREYFUSS, G.; PHILIPSON, L.; MATTAJ, I. W. Ribonucleoprotein particles in cellular processes. **Journal of Cell Biology**, v. 106, n. 5, p. 1419–1425, 1988.

ELBASHIR, S. M. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature**, v. 411, n. 6836, p. 494–498, 2001.

ESPINDOLA, J. A. A.; GUERRA, J. G. M.; ALMEIDA, D. L. de. (2005) Uso de leguminosas herbáceas para a adubação verde. In: AQUINO, A. M. de; ASSIS, R. L. de. (Ed.). **Agroecologia: princípios e técnicas para uma agricultura orgânica sustentável**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 435–448.

FAOSTAT. **Countries by commodity**, 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity>. Acesso em: 07 de nov. 2019.

FEI, Q.; XIA, R.; MEYERS, B. C. Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks. **Plant Cell**, v. 25, n. 7, p. 2400–2415, 2013.

FERGUSON, B. J.; GRESSHOFF, P. M. Soybean as a model legume. **Grain Legumes**, n. 53, p. 7, 2009.

FLETCHER, J. C. The ULTRAPETALA gene controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. **Development**, v. 128, n. 8, p. 1323–1333, 2001.

GILBERT, W. Origin of life: The RNA world. **Nature**, v. 319, n. 6055, p. 618, 1986.

- GOETTEL, W. et al. Systems and evolutionary characterization of microRNAs and their underlying regulatory networks in soybean cotyledons. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.
- GOLDBERG, R. B.; DE PAIVA, G.; YADEGARI, R. Plant embryogenesis: Zygote to seed. **Science**, v. 266, n. 5185, p. 605–614, 1994.
- GOODSTEIN, D. M. et al. Phytozome: A comparative platform for green plant genomics. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, 2012.
- GRIFFITHS-JONES, S. et al. Rfam: An RNA family database. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 1, p. 439–441, 2003.
- GROßHANS, H.; FILIPOWICZ, W. Molecular biology: The expanding world of small RNAs. **Nature**, v. 451, n. 7177, p. 414–416, 2008.
- GUAN, Q. et al. Heat stress induction of miR398 triggers a regulatory loop that is critical for thermotolerance in Arabidopsis. **Plant Journal**, v. 74, n. 5, p. 840–851, 2013.
- HAMILTON, A. J.; BAULCOMBE, D. C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. **Science**, v. 286, n. 5441, p. 950–952, 1999.
- HAN, Y. et al. Domestication footprints anchor genomic regions of agronomic importance in soybeans. **New Phytologist**, v. 209, n. 2, p. 871–884, 2016.
- HERTEL, J.; LANGENBERGER, D.; STADLER, P. F. (2014) Computational Prediction of MicroRNA Genes. In: GORODKIN, J.; RUZZO, W. L. (Eds.). **RNA Sequence, Structure, and Function: Computational and Bioinformatic Methods**. New York, NY: Humana Press, p. 437–456.
- HU, W.; ALVAREZ-DOMINGUEZ, J. R.; LODISH, H. F. Regulation of mammalian cell differentiation by long non-coding RNAs. **EMBO Reports**, v. 13, n. 11, p. 971–983, 2012.
- HUANG, K. et al. FASTmiR: an RNA-based sensor for in vitro quantification and live-cell localization of small RNAs. **Nucleic acids research**, v. 45, n. 14, p. e130, 2017.
- HUIJSER, P.; SCHMID, M. The control of developmental phase transitions in plants. **Development**, v. 138, n. 19, p. 4117–4129, 2011.
- HÜTTENHOFER, A.; SCHATTNER, P.; POLACEK, N. Non-coding RNAs: Hope or hype? **Trends in Genetics**, v. 21, n. 5, p. 289–297, 2005.
- HYMOWITZ, T. (2008) The History of the Soybean. In: JOHNSON, L. A.; WHITE, P. J.; GALLOWAY, R. (Eds.). **Soybeans: Chemistry, Production, Processing, and Utilization**. Urbana, Illinois, USA: AOCS Press., p. 1–31.

- HYMOWITZ, T. On the domestication of the Soybean. **Economic Botany**, v. 24, n.4, p. 408–421, 1970.
- HYMOWITZ, T.; NEWELL, C. A. Taxonomy of the genus *Glycine*, domestication and uses of soybeans. **Economic Botany**, v. 35, n. 3, p. 272–288, 1981.
- ISLAM, W. et al. Plant microRNAs: Front line players against invading pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 118, p. 9–17, 2018.
- IWASAKI, Y. W.; SIOMI, M. C.; SIOMI, H. PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions. **Annual Review of Biochemistry**, v. 84, n. 1, p. 405–433, 2015.
- JANN, R. C.; AMEN, R. D. What is germination? In: KHAN, A. A. (ed.) **The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination**. New York, Elsevier/North Holland Inc. – 2.ed. –, p. 7-28, 1980.
- JOSHI, T. et al. Prediction of novel miRNAs and associated target genes in *Glycine max*. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. S14, 2010.
- KHAN, G. A. et al. MicroRNAs as regulators of root development and architecture. **Plant Molecular Biology**, v. 77, n. 1, p. 47–58, 2011.
- KIDNER, C. A.; MARTIENSSEN, R. A. The developmental role of microRNA in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 1, p. 38–44, 2005.
- KIM, J. Y. et al. Overexpression of microRNA395c or 395e affects differently the seed germination of *Arabidopsis thaliana* under stress conditions. **Planta**, v. 232, n. 6, p. 1447–1454, 2010.
- KIM, M. Y. et al. Whole-genome sequencing and intensive analysis of the undomesticated soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 51, p. 22032–22037, 2010.
- KOCH, L. easiRNAs — guardians of the plant genome. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, n. 5, p. 288–288, 2014.
- KOMIYA, R. Biogenesis of diverse plant phasiRNAs involves an miRNA-trigger and Dicer-processing. **Journal of Plant Research**, v. 130, n. 1, p. 17–23, 2017.
- KOZOMARA, A.; BIRGAOANU, M.; GRIFFITHS-JONES, S. MiRBase: From microRNA sequences to function. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D155–D162, 2019.
- KOZOMARA, A.; GRIFFITHS-JONES, S. MiRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D68–D73, 2014.
- LAU, N. C. et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 858–862, 2001.

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**, v. 75, n. 5, p. 843–854, 1993.

LI, Z. F.; ZHANG, Y. C.; CHEN, Y. Q. MiRNAs and lncRNAs in reproductive development. **Plant Science**, v. 238, p. 46–52, 2015.

LIU, P. P. et al. Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 52, n. 1, p. 133–146, 2007.

LIU, X. et al. Long Non-coding RNAs and Their Biological Roles in Plants. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 13, n. 3, p. 137–147, 2015.

LLAVE, C. et al. Endogenous and Silencing-Associated Small RNAs in Plants. **The Plant Cell**, v. 14, n. 7, p. 1605–1619, 2002.

MALLORY, A. C. et al. MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. **Current Biology**, v. 14, n. 12, p. 1035–1046, 2004.

MALLORY, A. C.; BARTEL, D. P.; BARTEL, B. MicroRNA-directed regulation of Arabidopsis Auxin Response Factor17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. **Plant Cell**, v. 17, n. 5, p. 1360–1375, 2005.

MANGRAUTHIA, S. K. et al. Genome-wide changes in microRNA expression during short and prolonged heat stress and recovery in contrasting rice cultivars. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 9, p. 2399–2412, 2017.

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p.

MARTIN, R. C.; MARTÍNEZ-ANDÚJAR, C.; NONOGAKI, H. (2012) Role of miRNAs in Seed Development. In: SUNKAR, R (ed.), **MicroRNAs in Plant Development and Stress Responses**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 109-121.

MATHIONI, S. M.; MEYERS, B. C. (2017) phasiRNAs (phased, secondary, small interfering RNAs). In: PEREIRA, T. C. (Org.). **Introdução ao universo dos non-coding RNAs**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p. 143-147.

MATTICK, J. S. Non-coding RNAs: The architects of eukaryotic complexity. **EMBO Reports**, v. 2, n. 11, p. 986–991, 2001.

MAXWELL, E.; FOURNIER, M. The Small Nucleolar RNAs. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, n. 1, p. 897–934, 1995.

MCHALE, L. et al. Plant NBS-LRR proteins: Adaptable guards. **Genome Biology**, v. 7, n. 4, 2006.

MI, S. et al. Sorting of Small RNAs into Arabidopsis Argonaute Complexes Is Directed by the 5' Terminal Nucleotide. **Cell**, v. 133, n. 1, p. 116–127, 2008.

MILLAR, A. A.; LOHE, A.; WONG, G. Biology and Function of miR159 in Plants. **Plants**, v. 255, n. 8, p. 2–17, 2019.

MIYASHIMA, S. et al. A Comprehensive Expression Analysis of the Arabidopsis MICRORNA165/6 Gene Family during Embryogenesis Reveals a Conserved Role in Meristem Specification and a Non-Cell-Autonomous Function. **Plant and Cell Physiology**, v. 54, n. 5, p. 375–384, 2013.

MOREIRA, L. M. (Org.). **Ciências genômicas: fundamentos e aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2015. 403 p.

MORRIS, K. V.; MATTICK, J. S. The rise of regulatory RNA. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, n. 6, p. 423–437, 2014.

NAKANO, M. et al. Next-Generation Sequence Databases: RNA and Genomic Informatics Resources for Plants. **Plant Physiology**, v. 182, p. 136–146, 2020.

NAYA, L. et al. Regulation of copper homeostasis and biotic interactions by microRNA 398b in common bean. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

NODINE, M. D.; BARTEL, D. P. MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis. **Genes & development**, v. 24, n. 23, p. 2678–2692, 2010.

PAICU, C. et al. miRCat2: accurate prediction of plant and animal microRNAs from next-generation sequencing datasets. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 33, n. 16, p. 2446–2454, 2017.

PEIXOTO, A. M. et al. **Enciclopédia Agrícola Brasileira, S-Z**. vol. 6. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo: Fapesp, 2006. 632 p.

PERAGINE, A. et al. SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. **Genes and Development**, v. 18, n. 19, p. 2368–2379, 2004.

QU, Z.; ADELSON, D. L. Evolutionary conservation and functional roles of ncRNA. **Frontiers in Genetics**, v. 3, 2012.

QUAN, M., CHEN, J. & ZHANG, D. Exploring the Secrets of Long Noncoding RNAs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 3, p. 5467–5496, 2015.

RAMIREZ-PRADO, J. S. et al. (2017) Plant Epigenetics: Non-coding RNAs as Emerging Regulators. In: Rajewsky, N.; Jurga, S.; Barciszewski, J. (Eds.). **Plant Epigenetics, RNA Technologies**. Cham: Springer, p. 129–147.

REINHART, B. J. et al. MicroRNAs in plants. **Genes and Development**, v. 16, n. 13, p. 1616–1626, 2002.

RIAZ, M. N. **Soy Applications in Food**. 1.ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2006.

RIPOLL, J. J. et al. MicroRNA regulation of fruit growth. **Nature Plants**, v. 1, 2015.

SARAZIN, A.; VOINNET, O. Exploring new models of easiRNA biogenesis. **Nature Genetics**, v. 46, n. 6, p. 530–531, 2014.

SCHMUTZ, J. et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **Nature**, v. 463, n. 7278, p. 178–183, 2010.

SEDIVY, E. J.; WU, F.; HANZAWA, Y. Soybean domestication: the origin, genetic architecture and molecular bases. **New Phytologist**, v. 214, n. 2, p. 539–553, 2017.

SIENA, A. D. D.; BARROS, I. I de. (2017) RNAs longos não codificantes. In: PEREIRA, T. C. (Org.). **Introdução ao universo dos non-coding RNAs**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p. 95-132.

SINGH, A. et al. Balanced activity of microRNA166/165 and its target transcripts from the class III homeodomain-leucine zipper family regulates root growth in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Reports**, v. 33, n. 6, p. 945–953, jun. 2014.

SORKHEH, K.; RAJABPOOR, S. MicroRNA Mediated Translational Seed Biology: Discoveries on Genomics to Crop Improvement. **Avid Science Monograph Series**, p. 2–65, 2017.

STOCKS, M. B. et al. The UEA sRNA workbench: A suite of tools for analysing and visualizing next generation sequencing microRNA and small RNA datasets. **Bioinformatics**, v. 28, n. 15, p. 2059–2061, 2012.

STOESSER, G. et al. The EMBL Nucleotide Sequence Database. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 1, p. 18–24, 1999.

SUN, G. MicroRNAs and their diverse functions in plants. **Plant Molecular Biology**, v. 80, n. 1, p. 17–36, 2012.

SUNKAR, R.; LI, Y. F.; JAGADEESWARAN, G. Functions of microRNAs in plant stress responses. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 4, p. 196–203, 2012.

TAFT, R.; MATTICK, J. Increasing biological complexity is positively correlated with the relative genome-wide expansion of non-protein-coding DNA sequences. **Genome Biology**, v. 5, n. 1, p. P1, 2003.

TAFT, R. J.; PHEASANT, M.; MATTICK, J. S. The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. **BioEssays**, v. 29, n. 3, p. 288–299, 2007.

TAIZ, L. et al. **Plant Physiology and Development**. – 6.ed. – Sunderland: Sinauer Associates, 2015.

VAZQUEZ, F. et al. Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of Arabidopsis mRNAs. **Molecular Cell**, v. 16, n. 1, p. 69–79, 2004.

VENGLAT, P. et al. Genomics of seed development: Challenges and opportunities for genetic improvement of seed traits in crop plants. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 24–30, 2014.

WANG, C. Y. et al. MiR397b regulates both lignin content and seed number in Arabidopsis via modulating a laccase involved in lignin biosynthesis. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, n. 8, p. 1132–1142, 2014.

WANG, F.; AXTELL, M. J. AGO4 is specifically required for heterochromatic siRNA accumulation at Pol V-dependent loci in Arabidopsis thaliana. **Plant Journal**, v. 90, n. 1, p. 37–47, 2017.

WEINBERG, R. A.; PENMAN, S. Small molecular weight monodisperse nuclear RNA. **Journal of Molecular Biology**, v. 38, n. 3, p. 289–304, 1968.

WILLMANN, M. R. et al. MicroRNAs regulate the timing of embryo maturation in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 155, n. 4, p. 1871–1884, 2011.

WONG, C. E. et al. MicroRNAs in the shoot apical meristem of soybean. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 8, p. 2495–2506, 2011.

WU, M. F.; TIAN, Q.; REED, J. W. Arabidopsis microRNA 167 controls patterns of ARF6 and ARF8 expression, and regulates both female and male reproduction. **Development**, v. 133, n. 21, p. 4211–4218, 2006.

XIA, R.; XU, J.; MEYERS, B. C. The emergence, evolution, and diversification of the miR390-TAS3-ARF pathway in land plants. **Plant Cell**, v. 29, n. 6, p. 1232–1247, 2017.

XU, F. et al. Genome-wide identification of soybean microRNAs and their targets reveals their organ-specificity and responses to phosphate starvation. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, 2013.

XU, W. et al. Differential expression networks and inheritance patterns of long non-coding RNAs in castor bean seeds. **Plant Journal**, v. 95, n. 2, p. 324–340, 2018.

YANG, T. et al. The making of leaves: How small RNA networks modulate leaf development. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 2018.

YIN, D. D. et al. Identification of microRNAs and long non-coding RNAs involved in fatty acid biosynthesis in tree peony seeds. **Gene**, v. 666, p. 72–82, 2018.

YIN, X. et al. Detection and evolutionary analysis of soybean miRNAs responsive to soybean mosaic virus. **Planta**, v. 237, n. 5, p. 1213–1225, 2013.

YU, Y.; JIA, T.; CHEN, X. The ‘how’ and ‘where’ of plant microRNAs. **New Phytologist**, v. 216, n. 4, p. 1002–1017, 2017.

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, B.; WANG, Q.; PAN, X. MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants. **Journal of Cellular Physiology**, v. 210, n. 2, p. 279–289, 2007.

ZHANG, Z. et al. PMRD: Plant microRNA database. **Nucleic Acids Research**, v. 38, 2009.

ZHENG, Y. et al. Small RNA profiles in soybean primary root tips under water deficit. **BMC Systems Biology**, v. 10, n. 126, 2016.

ZHU, Q. H. et al. miR482 regulation of NBS-LRR defense genes during fungal pathogen infection in cotton. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e84390, 2013.

ZIEVE, G.; PENMAN, S. Small RNA species of the HeLa cell: Metabolism and subcellular localization. **Cell**, v. 8, n. 1, p. 19–31, 1976.

APÊNDICE

Tabela Suplementar S1: Sequências dos 228 potenciais miRNAs novos identificados nas bibliotecas de pequenos RNAs envolvidos com a embriogênese de sementes de soja.

miRNA	Sequência
miRseq1	CATGTGCCCCCTTCCCCATC
miRseq2	CATGTTGTTGTGAAGGGGTCAT
miRseq3	TCCAACGCCGGCGTCAACACC
miRseq4	ATCAATCGGAGATATGTGCATC
miRseq5	GTTGATTGAAAGATGGAGGCC
miRseq6	TATTTATAGGTCGCGTCGGGG
miRseq7	AGATGAGCCTCAGCCTGTAGAG
miRseq8	AATGGCTATCTTCTGAAGAGGA
miRseq9	CGTTGATTGAAAGATGGAGGCC
miRseq10	TAGGGAACTTTGCTGCTGCTT
miRseq11	CGAGGACTAAAATTTGAATTTT
miRseq12	GCCCTCTTCCTCTGTCATC
miRseq13	GAACGATGCACGACCTTGGCTC
miRseq14	CGATGTATAACTTTGGCTCCA
miRseq15	AGAGATGTATGGAGTGAGAGA
miRseq16	GTGGTATCAGGTCCTGCTTCA
miRseq17	TAGGTATACTGTTGGCAGCATC
miRseq18	TACACGGACGATAAAATGAAAT
miRseq19	ATGAGAAGCAAAGTTATGGGTG
miRseq20	ACTGTGTTTCCTTGGTTAAAG
miRseq21	TAAGTCGGACCGAGCATTTTCT
miRseq22	CAAATTCAAGACCGCCTTGCC
miRseq23	TAGGACGAGAAAAGAGCACACT
miRseq24	ACTTGAGATGCGGAGAGACTAC
miRseq25	TATTGGCTCGGTTCAATCAGA
miRseq26	CGTTTTGACATATTATGGGCCT
miRseq27	CCCTATCCCGCCATTGTCACTG
miRseq28	AGGGAATTCTGATGTGTATGGA
miRseq29	CGGACTATGCGGGTTTGGCCT
miRseq30	TTAGGGTTGCCAAGGTGAGGA
miRseq31	TTAGGCTAGAGAAGACTCCACC
miRseq32	TTGACGGCACTGAAGTAGAGGC
miRseq33	CACCCAAGAACCGTCGTAGATG
miRseq34	ATAAGGGGAAGATTGAGGCGCT
miRseq35	CTTAGGCAAACAGATATCGGTC
miRseq36	TGAATGGACTGTGGCTCGAGGC
miRseq37	CACGTGCTCTCCTTTTCCAGC
miRseq38	CCACCCCTGTCCATCGTCCTG
miRseq39	TATGAGTGACTTATTAGGTGTT

miRseq40	CACCCCCGACCTGCCAACACA
miRseq41	CCTCCACAAGCTCCACCACCT
miRseq42	ATTGTCCACTGCTTTGCCTGAG
miRseq43	GGTTGTGTTGGCAGGTCGGGGG
miRseq44	CAACATGAGAAATAGCGGCC
miRseq45	AAGTAGGGTCAGAGGGGAAGCT
miRseq46	CCTCTTTGAATTGCATGCGCCT
miRseq47	TCAGTCAATGTGTTGTCGCGCT
miRseq48	AGAGGTGTATGGAGTGAGAGA
miRseq49	TAGGCTAGAGAAGACTCCACC
miRseq50	TAGGACGAGAAAAGAGCACAC
miRseq51	AAGGGTTGCTAACAGAGTTTA
miRseq52	ATTCCGAGCTGTAATGATGAC
miRseq53	CTGAGAAAAACGCGAGCTGTT
miRseq54	ATTTTCACACATCCCCACCGT
miRseq55	CCGTGATCGCGTCGTGATGAAG
miRseq56	ATGGACTGTATGTCATGGGGGG
miRseq57	TTTGGGGGAGGATGGTGC GTGG
miRseq58	TTGGATTTTTGATTCTGGTGCC
miRseq59	TTGATTGTTCTATCTGCACTTC
miRseq60	TTCTGTGAATTCCTTGGACAAA
miRseq61	TGTTTCTATCTCGGCCCGGATT
miRseq62	TCATCGAGATGGGAGCATGGCT
miRseq63	CTCCCACTGTGGTCGCTGTACT
miRseq64	GAATTGCATTCTCTCAAAGGGC
miRseq65	AGGATGATCCTTGTTGGCTGAG
miRseq66	TTCCTATTGGTCCGTGATCGTA
miRseq67	TGTCCAAGGAAGTAGCTCATCT
miRseq68	AGGACTAAAAGTAAAAGCACT
miRseq69	CAAACTTGA ACTGGAGGCACC
miRseq70	TATGGATCCTGCAA ACTTGGTA
miRseq71	TGCTGCTAGTTCATGGATACC
miRseq72	CCGGAATTGAGCTTAGTA ACTT
miRseq73	AAGGGAAACGAACTATGTCTT
miRseq74	TAATGGAAAAAAGTTGAGGGAC
miRseq75	GGAGGAAGAATCTGGAAGGCCT
miRseq76	TTCCTGGGATTTGCTGACGTAC
miRseq77	AGGACGAAAAACAAAACAACA
miRseq78	AGTTCCTCTGAATGCTTCATA
miRseq79	TTTGGCTTGGAGGATGAACCCT
miRseq80	TCATGTGCCCCCTTCCCCATC
miRseq81	TCCATGCCTCTTGAAGACCTAG
miRseq82	AGGAGGGATAGTCACTGTGAC
miRseq83	TTAACATTGAGGACCACATAAG
miRseq84	GACTGATGATAGTAGAGACCT
miRseq85	GCCCTCTCTCCTCTGT CATCA

miRseq86	CTGGGTGAGAGGATTTTGTAG
miRseq87	CCTGGGCTGGAGATTTGGTCG
miRseq88	ATACAGGACTGTTGCTGGGCC
miRseq89	TCTCTCTGAAATCTTCGACCT
miRseq90	TCCCGTCAGTGTCAAAGATGTG
miRseq91	AAAGAAGAAAAAACTGGACCT
miRseq92	CTATGTGAGCCGTCAAGACCC
miRseq93	AACGATGCACGACCTTGGCTCC
miRseq94	TCATGTGCCCTCTTCCCAT
miRseq95	ATACTGGTGGCTATAGGATTGC
miRseq96	TTTTGGCCCTGGACTCACTGT
miRseq97	ATACAGGACTATTGCCGGGCC
miRseq98	CAAATTTGTTACCTCGTCGCGT
miRseq99	TACAGGACTGTTGCTGGGCCA
miRseq100	AGTTCTGTTGTCTGCTCTTTG
miRseq101	TCCCTTTGGATGCCTCTTGC
miRseq102	ACTGATCATTGGGGCCAACAGC
miRseq103	CGAGAATTTCTGGAAGGGCTC
miRseq104	TCTTCGTCACTTTCAAATTCCT
miRseq105	CTTCGTCATGATTGTTTTGCCT
miRseq106	TCCCTCAAAGGCTTCCAGTAT
miRseq107	CCCGAATTTGGATGTTGACTGT
miRseq108	ACGAAAGATCCCTGTGACGCCT
miRseq109	TTGAATGAAGAATCCCTTGCA
miRseq110	CGGATTGAGCATTATAGGGGA
miRseq111	GGAGAAGAAATTGCGAAGCTG
miRseq112	ACTCGTTGTCACTTTAGTCCT
miRseq113	AATTGGAAAAAGTGAGGCACG
miRseq114	ATATTTCTTGGTAGCTGGGCC
miRseq115	TCCTAGGTCCGTTTACATATG
miRseq116	TGAAGAACGAGAACAGCCCCT
miRseq117	AGAGGACCGATGTAGAATGAT
miRseq118	TTTTTGACCACTTCTTGGACGG
miRseq119	ATTCCATCTGAGTAGATCTGC
miRseq120	TCGATACGGGTCGCTCTCACC
miRseq121	CCGGATGAACTAGTGAAGTAGC
miRseq122	ACGATGTATAACTTTGGCTCC
miRseq123	CGCTTCAACAACCTCCATTCGT
miRseq124	GAATGATCGTCAATTAGAGCCT
miRseq125	GGCAAGTTGTGTTTGGCTATG
miRseq126	TCCAAATCCATGATTACCGCCT
miRseq127	ACGGATTGAGGCGAGAAATGGC
miRseq128	ACTGAGACTGCATCTGGCTGA
miRseq129	TAGAGGATCTAATTGGAGTGTT
miRseq130	CCGAAGGCTGTCCCATCCCT
miRseq131	ATTTGGACAAGTGAGAGATTGT

miRseq132	AAGATGGAGAAGCAGGGCACG
miRseq133	ATTCCATCGGAAGCGAGACCAA
miRseq134	TGGGGACTGTCCGGCCTTGCCGG
miRseq135	TCCCTCAAAGGCTTCCAGTATT
miRseq136	TTTTTATACACTGTTGATGGCT
miRseq137	TATGTTGGTAGGAAAACTCTG
miRseq138	AAGGGTTGCTTACAGAGTTTC
miRseq139	CCTGAGATGACTGCGGACGTA
miRseq140	TAACCGTTGGATCGTCTCGAAA
miRseq141	TTGGCTGAGAACAACAAGGGT
miRseq142	CGGAGACCGGCTTACAAAACCC
miRseq143	CAAATTCAAGACCGCTTTGCC
miRseq144	ATCCCTCTGTTCAATCGGTGG
miRseq145	CAATAGAAAATGGACTTGGCAC
miRseq146	TTTACGGAAAGTATACTGGCAC
miRseq147	CATAAAGGTCCCACATACATTG
miRseq148	AGGTATTGGCGCGCCTCAATT
miRseq149	CTTCCGGATGAACAATTTGTTC
miRseq150	GTTCCCAGGACTGTGGTCGCTG
miRseq151	TTTACTTGTAGCTCATCGGGA
miRseq152	AGTGATGGCCACGCGGGCTCTC
miRseq153	TGACTCAACGGACATAAGCACC
miRseq154	CGAGATCCGCGAGGCTGTTGC
miRseq155	GAGGACGAGGAGATGACTGATT
miRseq156	GCTGGAGATCAGGGACTGCC
miRseq157	TGTTCCCAGGACTGTGGTCGCT
miRseq158	CGTTCAGTTGAGCTTCAATCCT
miRseq159	CAATACTTTGGATCAGCTTCAC
miRseq160	ATGATGCCCGCCGAATGGTCTG
miRseq161	CCATGAATCCCAAACCACTG
miRseq162	TGACATTTCTCCACAATCTCT
miRseq163	TCACAAGGACTTGCCTACCT
miRseq164	TCAAATCTGGGCTTGGGGACC
miRseq165	CACCCCTGTCCCATCGTCTGT
miRseq166	CTGGGGAAGCAAGTAGATTAC
miRseq167	AGGCACGACGATGGATTGTAGC
miRseq168	TAACCGTTGGATCGCCTTGAAT
miRseq169	CGAGGAGGACTTGATTTTGATG
miRseq170	AGACAGGATGTTGAGGTGGCCT
miRseq171	TTGAGAGAACCTGGCGCAGCA
miRseq172	CAATCGGAGATATGTGCATCTT
miRseq173	CTAGTTTTCTTGGTGCGGGCC
miRseq174	ACACGACTAGGGTGCTCTGGT
miRseq175	AGGAGGTGTTCTATTTGTTGAC
miRseq176	GATGAGAGATTAGTCTGATGGC
miRseq177	TGGACTGTATGTCATGGGGGGT

miRseq178	TAACCTACTCCCCTACTTGCT
miRseq179	CGGAGGATTTGTTGGTTGATGC
miRseq180	GGTCAAAGGAGATTTGTTGGGC
miRseq181	AAAGCCATGACTTACACACGC
miRseq182	GTACGAAGACCTAATAAACTG
miRseq183	TGTAATTTTCTGTCTGGTTCCC
miRseq184	TTCCGGAAGAACAATTTGTGCT
miRseq185	TATTTGGATTGTGGAGTGGGTG
miRseq186	AACTTTGAGAGCATGGGTAAC
miRseq187	TGCGGTACCAGAGGCTGAGCCT
miRseq188	TCTGATCTCCTACCCCTGGCCT
miRseq189	CTCACTTCGTCATCGACGAG
miRseq190	ATCATGTTGTTGTGAAGGGGTC
miRseq191	ACCCAACCGGACATGAGGCC
miRseq192	TATTTCTTGGTAGCTGGGCCT
miRseq193	TCCCACCTCTACTACGCCCTC
miRseq194	TAGGGCAGCTAGGAATTGGGAC
miRseq195	GCTGGAATAGCTCAGTTGGCTA
miRseq196	CCGAGGTTGAATGTGGAGATC
miRseq197	TTGGGCTGTAGAGGATCGTTCT
miRseq198	TATTTTAGTCTCTAACCCCGAG
miRseq199	TTGCTTGGTGTAGTTCGGGTAC
miRseq200	TGTGCTTGGACTGAAGGGAGC
miRseq201	ATTCGAGAGTTGGATGGACCC
miRseq202	AGAACATAAACCTAACCCGG
miRseq203	TTTCGGTACGGTTCTCTAATC
miRseq204	CTCATGAGAACCGTAGGGCCTT
miRseq205	ATTTTGCGAATTTGAGGGACT
miRseq206	GCATACAGGGAGTCAAGCAGA
miRseq207	AATGGTGAGGATGAAGAGTAAC
miRseq208	GCATACAGGGAGTCAAGCGGG
miRseq209	TCCTGGGATTTGCTGACGTACC
miRseq210	TGGCGGAAGAAGAATCTGGACT
miRseq211	GGACGGAAAAAAGTGCAGGGAC
miRseq212	TAGAGGATCAAAGGTTTGGCT
miRseq213	CCCGTCTTAGTATAGTTCACT
miRseq214	AGACTTGGAGGACTACAATGCC
miRseq215	GCTACATCTGGACTCCACATCG
miRseq216	CCCGCAAACCTGTAGATAGA
miRseq217	CTCCGTTTGTCCGTCAGTCTGT
miRseq218	CTCCCCAAGACCGTCTAACCC
miRseq219	AAAGTCTGAAAGGCCTGCAAAC
miRseq220	TTTGTCTGGATCCCTGTCTGC
miRseq221	CTGGCGGTTCCCATGCATGGC
miRseq222	CCTGAGATGCGTGCGGACGTA
miRseq223	GTTCCCCTTAATGCTTCATTG

miRseq224	AAAGACGACAGTATTGAACAGC
miRseq225	TATCAGGGACTTGGAACAATGA
miRseq226	TAGGGAAACTTTGCTGCTGCT
miRseq227	TACCATATCCTCCGGCCCAGGG
miRseq228	TAATTGGAGCAGGTCGGGGATC

Tabela Suplementar S2: Potenciais alvos dos miRNAs candidatos identificados.

miRNA	Target	Gene	Annotation	Expectation	miRNA length	miRNA aligned fragment	Target aligned fragment	Inhibition
miRseq116	Glyma.06G251800.1	ULT2	Developmental regulator, ULTRAPETALA	0.0	21	UGAAGAACGAGAACAGCCCCU	AGGGGCUGUUCUCGUUCUUA	Cleavage
miRseq116	Glyma.U042700.1	ULT2	Developmental regulator, ULTRAPETALA	0.0	21	UGAAGAACGAGAACAGCCCCU	AGGGGCUGUUCUCGUUCUUA	Cleavage
miRseq116	Glyma.06G252200.1	ULT2	Developmental regulator, ULTRAPETALA	0.0	21	UGAAGAACGAGAACAGCCCCU	AGGGGCUGUUCUCGUUCUUA	Cleavage
miRseq116	Glyma.06G252500.1	ULT2	Developmental regulator, ULTRAPETALA	0.0	21	UGAAGAACGAGAACAGCCCCU	AGGGGCUGUUCUCGUUCUUA	Cleavage
miRseq116	Glyma.U041900.1	ULT2	Developmental regulator, ULTRAPETALA	0.0	21	UGAAGAACGAGAACAGCCCCU	AGGGGCUGUUCUCGUUCUUA	Cleavage
miRseq116	Glyma.06G252000.1	ULT2	Developmental regulator, ULTRAPETALA	0.0	21	UGAAGAACGAGAACAGCCCCU	AGGGGCUGUUCUCGUUCUUA	Cleavage
miRseq116	Glyma.06G252100.1	ULT2	Developmental regulator, ULTRAPETALA	0.0	21	UGAAGAACGAGAACAGCCCCU	AGGGGCUGUUCUCGUUCUUA	Cleavage
miRseq116	Glyma.06G251300.1	ULT2	Developmental regulator, ULTRAPETALA	0.0	21	UGAAGAACGAGAACAGCCCCU	AGGGGCUGUUCUCGUUCUUA	Cleavage
miRseq116	Glyma.06G250900.1	ULT2	Developmental regulator, ULTRAPETALA	0.0	21	UGAAGAACGAGAACAGCCCCU	AGGGGCUGUUCUCGUUCUUA	Cleavage
miRseq116	Glyma.06G251600.1	ULT2	Developmental regulator, ULTRAPETALA	0.0	21	UGAAGAACGAGAACAGCCCCU	AGGGGCUGUUCUCGUUCUUA	Cleavage
miRseq116	Glyma.06G251700.1	ULT2	Developmental regulator, ULTRAPETALA	0.0	21	UGAAGAACGAGAACAGCCCCU	AGGGGCUGUUCUCGUUCUUA	Cleavage
miRseq116	Glyma.06G250400.1	ULT2	Developmental regulator, ULTRAPETALA	0.0	21	UGAAGAACGAGAACAGCCCCU	AGGGGCUGUUCUCGUUCUUA	Cleavage
miRseq116	Glyma.06G250500.1	ULT2	Developmental regulator, ULTRAPETALA	0.0	21	UGAAGAACGAGAACAGCCCCU	AGGGGCUGUUCUCGUUCUUA	Cleavage
miRseq116	Glyma.06G250300.1	ULT2	Developmental regulator, ULTRAPETALA	0.0	21	UGAAGAACGAGAACAGCCCCU	AGGGGCUGUUCUCGUUCUUA	Cleavage
miRseq131	Glyma.14G043100.1	AtRLP6,RLP6	receptor like protein 6	0.0	22	AUUUGGACAAGUGAGAGAUUGU	ACAAUCUCACUUGUCCAAU	Cleavage
miRseq131	Glyma.14G019400.1	AGL5,SHP2	K-box region and MADS-box transcription factor family protein	0.0	22	AUUUGGACAAGUGAGAGAUUGU	ACAAUCUCACUUGUCCAAU	Cleavage
miRseq131	Glyma.14G043300.1	AtRLP33,RLP33	receptor like protein 33	0.0	22	AUUUGGACAAGUGAGAGAUUGU	ACAAUCUCACUUGUCCAAU	Cleavage
miRseq131	Glyma.14G042900.1	AtRLP33,RLP33	receptor like protein 33	0.0	22	AUUUGGACAAGUGAGAGAUUGU	ACAAUCUCACUUGUCCAAU	Cleavage
miRseq131	Glyma.14G042300.1	AtRLP35,RLP35	receptor like protein 35	0.0	22	AUUUGGACAAGUGAGAGAUUGU	ACAAUCUCACUUGUCCAAU	Cleavage
miRseq131	Glyma.14G042100.1	AtRLP7,RLP7	receptor like protein 7	0.0	22	AUUUGGACAAGUGAGAGAUUGU	ACAAUCUCACUUGUCCAAU	Cleavage
miRseq131	Glyma.14G044400.1	AtRLP6,RLP6	receptor like protein 6	0.0	22	AUUUGGACAAGUGAGAGAUUGU	ACAAUCUCACUUGUCCAAU	Cleavage
miRseq131	Glyma.14G042400.1	AtRLP52,RLP52	receptor like protein 52	0.0	22	AUUUGGACAAGUGAGAGAUUGU	AUAAUCUCACUUGUCCAAU	Cleavage
miRseq139	Glyma.07G147700.1	AtTLP1,TLP1	tubby like protein 1	0.0	21	CCUGAGAUAGUCGCGGACGUA	UACGUCCGAGUCAUCUCAGG	Cleavage
miRseq154	Glyma.11G216500.1	RGL2	RGA-like 2	0.0	21	CGAGAUCCGCGAGGCGUUGC	GCAACAGCCUCGCGGAUCUCG	Cleavage
miRseq154	Glyma.18G040000.1	RGL2	RGA-like 2	0.0	21	CGAGAUCCGCGAGGCGUUGC	GCAACAGCCUCGCGGAUCUCG	Cleavage
miRseq161	Glyma.12G218100.5	EMB2763	ribonuclease II family protein	0.0	21	CCAUGAAUUCCAAACACUG	CAGUGGUUUGGAAUUAUGG	Cleavage
miRseq161	Glyma.12G218100.3	EMB2763	ribonuclease II family protein	0.0	21	CCAUGAAUUCCAAACACUG	CAGUGGUUUGGAAUUAUGG	Cleavage
miRseq161	Glyma.12G218100.4	EMB2763	ribonuclease II family protein	0.0	21	CCAUGAAUUCCAAACACUG	CAGUGGUUUGGAAUUAUGG	Cleavage
miRseq161	Glyma.12G218100.2	EMB2763	ribonuclease II family protein	0.0	21	CCAUGAAUUCCAAACACUG	CAGUGGUUUGGAAUUAUGG	Cleavage
miRseq36	Glyma.15G220600.1	CPR30	F-box and associated interaction domains-containing protein	0.0	22	UGAUGGACUGUGGCUAGGCG	UCCUCGAGCCACAGUCCAUUA	Cleavage
miRseq52	Glyma.15G232600.2	RLM1	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family	0.0	21	AUUCGAGCUGUAUUGAUGAC	GUCAUAUUACAGCUCGGAAU	Cleavage
miRseq52	Glyma.15G232600.3	RLM1	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family	0.0	21	AUUCGAGCUGUAUUGAUGAC	GUCAUAUUACAGCUCGGAAU	Cleavage
miRseq52	Glyma.15G232600.1	RLM1	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family	0.0	21	AUUCGAGCUGUAUUGAUGAC	GUCAUAUUACAGCUCGGAAU	Cleavage
miRseq52	Glyma.15G232600.5	RLM1	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family	0.0	21	AUUCGAGCUGUAUUGAUGAC	GUCAUAUUACAGCUCGGAAU	Cleavage
miRseq52	Glyma.15G232600.6	RLM1	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family	0.0	21	AUUCGAGCUGUAUUGAUGAC	GUCAUAUUACAGCUCGGAAU	Cleavage
miRseq52	Glyma.15G232600.4	RLM1	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family	0.0	21	AUUCGAGCUGUAUUGAUGAC	GUCAUAUUACAGCUCGGAAU	Cleavage
miRseq53	Glyma.15G268500.1	ATCS,CSY4	Citrate synthase family protein	0.0	22	CUGAGAAAAACGCGAGCUGUU	AACAGCUCGCGUUUUUCUCAG	Cleavage
miRseq86	Glyma.20G184200.1	ATMYB5,MYB5	myb domain protein 5	0.0	21	CUGGGUGAGAGAUUUUGUAG	CUACAAAUCUCUACCCAG	Cleavage
miRseq106	Glyma.12G228800.1	TTL1	tetratricopetide-repeat thioredoxin-like 1	0.5	21	UCCCUCAAAGGCUUCCAGUUAU	ACACUGGAAGCCUUGAGGGG	Cleavage
miRseq11	Glyma.06G233300.6	EBS	PHD finger family protein / bromo-adjacent homology (BAH) domain-containing protein	0.5	22	CGAGGACUAAAUUUGAAUUUU	AAAUAUCAAUUUUGUUCUCG	Cleavage
miRseq11	Glyma.06G233300.7	EBS	PHD finger family protein / bromo-adjacent homology (BAH) domain-containing protein	0.5	22	CGAGGACUAAAUUUGAAUUUU	AAAUAUCAAUUUUGUUCUCG	Cleavage
miRseq116	Glyma.U005900.1	ULT2	Developmental regulator, ULTRAPETALA	0.5	21	UGAAGAACGAGAACAGCCCCU	AGGGGCUGUUCUCGUUCUUA	Cleavage
miRseq116	Glyma.06G253500.1	ULT,ULT1	Developmental regulator, ULTRAPETALA	0.5	21	UGAAGAACGAGAACAGCCCCU	AGGGGUUGUUCUCGUUCUUA	Cleavage
miRseq116	Glyma.06G251000.1	ULT2	Developmental regulator, ULTRAPETALA	0.5	21	UGAAGAACGAGAACAGCCCCU	AGGGGCUGUUCUCGUUCUUA	Cleavage
miRseq116	Glyma.06G253100.1	ULT2	Developmental regulator, ULTRAPETALA	0.5	21	UGAAGAACGAGAACAGCCCCU	AGGGGCUGUUCUCGUUCUUA	Cleavage
miRseq124	Glyma.05G145000.2	ATMRP3,MRP3	multidrug resistance-associated protein 3	0.5	22	GAAUGAUCGUAUUAGAGCCU	AGGCUCUAAUUGAGGAUUAUC	Cleavage
miRseq124	Glyma.05G145000.1	ATMRP3,MRP3	multidrug resistance-associated protein 3	0.5	22	GAAUGAUCGUAUUAGAGCCU	AGGCUCUAAUUGAGGAUUAUC	Cleavage
miRseq124	Glyma.08G101500.1	ATMRP3,MRP3	multidrug resistance-associated protein 3	0.5	22	GAAUGAUCGUAUUAGAGCCU	AGGCUCUAAUUGAGGAUUAUC	Cleavage
miRseq131	Glyma.14G042700.1	AtRLP6,RLP6	receptor like protein 6	0.5	22	AUUUGGACAAGUGAGAGAUUGU	ACAAUCUCUAAUUGUCCAAU	Cleavage
miRseq131	Glyma.14G046000.1	AtRLP33,RLP33	receptor like protein 33	0.5	22	AUUUGGACAAGUGAGAGAUUGU	ACAAUCUCUAAUUGUCCAAU	Cleavage
miRseq132	Glyma.08G173400.1	anac021,ANAC022,NAC1	NAC domain containing protein 1	0.5	21	AAGAUGGAGAAGCAGGGCACG	AGUGCCUGCUUCUCCAUUUU	Cleavage
miRseq132	Glyma.15G254000.1	anac021,ANAC022,NAC1	NAC domain containing protein 1	0.5	21	AAGAUGGAGAAGCAGGGCACG	AGUGCCUGCUUCUCCAUUUU	Cleavage
miRseq135	Glyma.12G228800.1	TTL1	tetratricopetide-repeat thioredoxin-like 1	0.5	22	UCCCUCAAAGGCUUCCAGUUAU	GACACUGGAAGCCUUGAGGGG	Cleavage

miRseq181	Glyma.07G187200.1	CPR30	F-box and associated interaction domains-containing protein	0.5	21	AAAGCAUGACUACACACGC	GUGUGUGUAAGUCAUGGUUUU	Cleavage
miRseq183	Glyma.13G295200.1	SOM	Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type family protein	0.5	22	UGUAAUUUUUCUGUCUGGUUCC	GGAACAGAUAGAAAUAACA	Cleavage
miRseq77	Glyma.03G085700.1	MHK	Protein kinase superfamily protein	0.5	22	AGGACGAAAAACAACAACA	UGUUUGUUUUUUUUUCGUCU	Cleavage
miRseq115	Glyma.16G217300.1	37104	Stabilizer of iron transporter SufD / Polynucleotidyl transferase	1.0	22	UCCUAGGUCGDUUCACAUAG	GAUUGUGAGACUGACCUAGGA	Cleavage
miRseq116	Glyma.06G251500.1	ULT,ULT1	Developmental regulator, ULTRAPETALA	1.0	21	UGAAGAACGAGAACAGCCCU	AGCGGCUUUCUGUUCUUA	Cleavage
miRseq117	Glyma.15G246500.1	EMB3012	embryo defective 3012	1.0	21	AGAGACCGAUGUAGAAUGAU	AGCAUUCUACAUUGGUCCUA	Cleavage
miRseq117	Glyma.15G246500.1	EMB3012	embryo defective 3012	1.0	21	AGAGACCGAUGUAGAAUGAU	AACAUUCUACAUUGGUCCUU	Cleavage
miRseq124	Glyma.08G101700.1	ATMRP14,MRP14	multidrug resistance-associated protein 14	1.0	22	GAAUGAUCGCAUUAGAGCCU	AGGCUCUAAUUGAUGAUUUAUC	Cleavage
miRseq131	Glyma.14G106400.1	AtRLP6,RLP6	receptor like protein 6	1.0	22	AUUUGGACAAGUGAGAGAUUGU	AUAAUCUCUUGCUUGCCAAU	Cleavage
miRseq132	Glyma.20G030500.1	ATWRKY72,WRKY72	WRKY DNA-binding protein 72	1.0	21	AAGAUGGAGAAGCAGGGCACG	GAUGCACUGCUUCUCAUCU	Cleavage
miRseq132	Glyma.02G020300.1	ATWRKY72,WRKY72	WRKY DNA-binding protein 72	1.0	21	AAGAUGGAGAAGCAGGGCACG	GAUGCACUGCUUCUCAUCU	Cleavage
miRseq132	Glyma.02G020300.2	ATWRKY72,WRKY72	WRKY DNA-binding protein 72	1.0	21	AAGAUGGAGAAGCAGGGCACG	GAUGCACUGCUUCUCAUCU	Cleavage
miRseq132	Glyma.01G043300.1	ATWRKY72,WRKY72	WRKY DNA-binding protein 72	1.0	21	AAGAUGGAGAAGCAGGGCACG	GAUGCACUGCUUCUCAUCU	Cleavage
miRseq132	Glyma.02G020300.3	ATWRKY72,WRKY72	WRKY DNA-binding protein 72	1.0	21	AAGAUGGAGAAGCAGGGCACG	GAUGCACUGCUUCUCAUCU	Cleavage
miRseq132	Glyma.01G043300.2	ATWRKY72,WRKY72	WRKY DNA-binding protein 72	1.0	21	AAGAUGGAGAAGCAGGGCACG	GAUGCACUGCUUCUCAUCU	Cleavage
miRseq199	Glyma.09G167100.1	37104	Stabilizer of iron transporter SufD / Polynucleotidyl transferase	1.0	22	UUGCUUGGUGUAGUUCGGUAC	GCACCCGAGCUGACCAAGCAA	Cleavage
miRseq199	Glyma.16G217300.1	37104	Stabilizer of iron transporter SufD / Polynucleotidyl transferase	1.0	22	UUGCUUGGUGUAGUUCGGUAC	GCACCCGAGCUGACCAAGCAA	Cleavage
miRseq41	Glyma.17G210000.1	AtCXE17,CXE17	carboxyesterase 17	1.0	21	CCUCCACAAGCUCCACCACCU	AAGAGGUGGAGCUUGGAGG	Cleavage
miRseq84	Glyma.06G176100.1	CYP71A22	cytochrome P450, family 71, subfamily A, polypeptide 22	1.0	21	GACUGAUGAUGAUGAGACCU	AUGGCUCUACUACUACGAC	Cleavage
miRseq86	Glyma.10G206400.1	ATMYB5,MYB5	myb domain protein 5	1.0	21	CUGGGUGAGAGAUUUUGUAG	CUACAAAUCUCUACCCAA	Cleavage
miRseq91	Glyma.05G228400.1	AtSTP14,STP14	sugar transporter 14	1.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	AAUUCUAGUUUUUUUUUCUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.09G239400.1	ATHB-3,ATHB3,HAT7,HB-3	homeobox 3	1.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	UUUCUAGUUUUUUUUUCUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.20G185000.1	IDL1	inflorescence deficient in abscission (IDA)-like 1	1.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	UUUCUAGUUUUUUUUUCUUU	Cleavage
miRseq100	Glyma.20G008700.3	REM39,VRN1	AP2/B3-like transcriptional factor family protein	1.5	21	AGUUCUGUUGUCUGCUCUUUG	AAAAAGCAGACAACAGAAU	Cleavage
miRseq100	Glyma.20G008700.2	REM39,VRN1	AP2/B3-like transcriptional factor family protein	1.5	21	AGUUCUGUUGUCUGCUCUUUG	AAAAAGCAGACAACAGAAU	Cleavage
miRseq100	Glyma.20G008700.1	REM39,VRN1	AP2/B3-like transcriptional factor family protein	1.5	21	AGUUCUGUUGUCUGCUCUUUG	AAAAAGCAGACAACAGAAU	Cleavage
miRseq106	Glyma.05G045300.1	RGL,RGL1	RGA-like 1	1.5	21	UCCUCAAGGCUUCCAGUUAU	AUAUUGGAGCCUUGAGGGU	Cleavage
miRseq106	Glyma.17G127500.1	RGL,RGL1	RGA-like 1	1.5	21	UCCUCAAGGCUUCCAGUUAU	AUAUUGGAGCCUUGAGGGU	Cleavage
miRseq109	Glyma.07G259500.2	ATRBP45B,RBP45B	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	1.5	22	UUGAAUGAAGAAUCCUUGGCA	AUGCAAGGGGUUCUUGUCAA	Cleavage
miRseq109	Glyma.07G259500.1	ATRBP45B,RBP45B	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	1.5	22	UUGAAUGAAGAAUCCUUGGCA	AUGCAAGGGGUUCUUGUCAA	Cleavage
miRseq109	Glyma.17G014800.1	ATRBP45B,RBP45B	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	1.5	22	UUGAAUGAAGAAUCCUUGGCA	AUGCAAGGGGUUCUUGUCAA	Cleavage
miRseq111	Glyma.08G284300.1	KNAT6,KNAT6L,KNAT6S	KNOTTED1-like homeobox gene 6	1.5	21	GGAGAAGAAUUGCGAAGCUG	UCGCUUUGCAAUUUUUCUUC	Cleavage
miRseq116	Glyma.U001400.1	ULT2	Developmental regulator, ULTRAPETALA	1.5	21	UGAAGAACGAGAACAGCCCU	AGGGGCGUUCUAGUUCUUA	Cleavage
miRseq117	Glyma.20G074700.1	ATZW10	centromere/kinetochore protein, putative (ZW10)	1.5	21	AGAGACCGAUGUAGAAUGAU	AACAUUCUACAUUGGUCCUUC	Cleavage
miRseq118	Glyma.14G057400.1	MRH1	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	1.5	22	UUUUUGACCACUUCUUGGACGG	UCAUCCAAGAAUUGGCAAAA	Translation
miRseq119	Glyma.08G224500.1	ATSUG1,RPT6A	regulatory particle triple-A ATPase 6A	1.5	21	AUUCUACUGAGUAGUAGUUGC	UUGGAUCUGCUGGGAUGAAU	Cleavage
miRseq119	Glyma.07G002200.1	ATSUG1,RPT6A	regulatory particle triple-A ATPase 6A	1.5	21	AUUCUACUGAGUAGUAGUUGC	UUGGAUCUGCUGGGAUGAAU	Cleavage
miRseq122	Glyma.09G150500.1	CRK25	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 25	1.5	21	ACGAUGUAUAACUUGGCUCC	CGACUCAAGUUUAUACUUGU	Cleavage
miRseq132	Glyma.10G111400.1	AtWRKY42,WRKY42	WRKY family transcription factor	1.5	21	AAGAUGGAGAAGCAGGGCACG	GAUGUACUGCUUCUCAUCU	Cleavage
miRseq132	Glyma.18G124700.1	ATWRKY72,WRKY72	WRKY DNA-binding protein 72	1.5	21	AAGAUGGAGAAGCAGGGCACG	GAUGCACUGUUUCUCAUCU	Cleavage
miRseq135	Glyma.05G045300.1	RGL,RGL1	RGA-like 1	1.5	22	UCCUCAAGGCUUCCAGUUAU	AAUUAUUGGAGCCUUGAGGGU	Cleavage
miRseq135	Glyma.17G127500.1	RGL,RGL1	RGA-like 1	1.5	22	UCCUCAAGGCUUCCAGUUAU	AAUUAUUGGAGCCUUGAGGGU	Cleavage
miRseq136	Glyma.01G161800.1	AKRP,EMB16,EMB2036	ankyrin repeat protein	1.5	22	UUUUUAUACACUGUUGGCUCC	UUACAUUGAUGUUAUGAAAA	Cleavage
miRseq14	Glyma.09G150500.1	CRK25	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 25	1.5	21	CGAUGUAUAACUUGGCUCCA	UCGACUCAAGUUUAUACUUG	Cleavage
miRseq145	Glyma.14G001900.1	IDH-1,IDH1	isocitrate dehydrogenase 1	1.5	22	CAAUAGAAAAUGGACUUGGCAC	AAUCAAGUUUAUUAUUAUUG	Cleavage
miRseq15	Glyma.06G242100.1	SPA3	SPA1-related 3	1.5	21	AGAGAUGUAGGAGUAGAGAGA	UUUCUCUCCAUUAUUCUCU	Cleavage
miRseq15	Glyma.06G242100.3	SPA3	SPA1-related 3	1.5	21	AGAGAUGUAGGAGUAGAGAGA	UUUCUCUCCAUUAUUCUCU	Cleavage
miRseq154	Glyma.08G095800.1	RGA,RGA1	GRAS family transcription factor family protein	1.5	21	CGAGAUCGCGAGGCUUGUC	CGAACAGCCUCGCGAUCUCG	Cleavage
miRseq154	Glyma.05G140400.1	RGA,RGA1	GRAS family transcription factor family protein	1.5	21	CGAGAUCGCGAGGCUUGUC	CGAACAGCCUCGCGAUCUCG	Cleavage
miRseq164	Glyma.19G196500.1	emb2735	embryo defective 2735	1.5	21	UCAAUCUGGGCUUGGGGACC	GGUCCCAAGUCCAGAUUUGG	Cleavage
miRseq182	Glyma.13G295200.1	SOM	Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type family protein	1.5	22	GUACGAAGACUAAUAAACUG	CAUUUUUAUAGGUCUGCGUAC	Cleavage
miRseq184	Glyma.03G013800.1	DTA2	downstream target of AGL15 2	1.5	22	UUCGGAAGAAUUAUUGGCU	AGAACAUAUUGUUCUACGGAA	Cleavage
miRseq195	Glyma.19G167900.8	SDG18,SUVR2	SET-domain containing protein lysine methyltransferase family protein	1.5	22	GCUGGAAUAGCUCAGUUGGCUA	CAGCCAUAUAGGCUUCCAGU	Cleavage
miRseq195	Glyma.19G167900.3	SDG18,SUVR2	SET-domain containing protein lysine methyltransferase family protein	1.5	22	GCUGGAAUAGCUCAGUUGGCUA	CAGCCAUAUAGGCUUCCAGU	Cleavage
miRseq195	Glyma.19G167900.4	SDG18,SUVR2	SET-domain containing protein lysine methyltransferase family protein	1.5	22	GCUGGAAUAGCUCAGUUGGCUA	CAGCCAUAUAGGCUUCCAGU	Cleavage

miRseq195	Glyma.19G167900.6	SDG18,SUVR2	SET-domain containing protein lysine methyltransferase family protein	1.5	22	GCUGGAAUAGCUCAGUUGGCUA	CAGCCAAUUGAGCUGUUCAGU	Cleavage
miRseq195	Glyma.19G167900.5	SDG18,SUVR2	SET-domain containing protein lysine methyltransferase family protein	1.5	22	GCUGGAAUAGCUCAGUUGGCUA	CAGCCAAUUGAGCUGUUCAGU	Cleavage
miRseq195	Glyma.19G167900.2	SDG18,SUVR2	SET-domain containing protein lysine methyltransferase family protein	1.5	22	GCUGGAAUAGCUCAGUUGGCUA	CAGCCAAUUGAGCUGUUCAGU	Cleavage
miRseq195	Glyma.19G167900.7	SDG18,SUVR2	SET-domain containing protein lysine methyltransferase family protein	1.5	22	GCUGGAAUAGCUCAGUUGGCUA	CAGCCAAUUGAGCUGUUCAGU	Cleavage
miRseq195	Glyma.19G167900.1	SDG18,SUVR2	SET-domain containing protein lysine methyltransferase family protein	1.5	22	GCUGGAAUAGCUCAGUUGGCUA	CAGCCAAUUGAGCUGUUCAGU	Cleavage
miRseq204	Glyma.15G247500.1	AtRLP33,RLP33	receptor like protein 33	1.5	22	CUCAUGAGAACCGUAGGGCCUU	AAGGCCCUAGGGUUCUCAUGAG	Cleavage
miRseq204	Glyma.19G060900.1	ATCLASP,CLASP	CLIP-associated protein	1.5	22	CUCAUGAGAACCGUAGGGCCUU	AAGGCCCUAAGGUUCUCAUGAG	Cleavage
miRseq209	Glyma.08G001100.1	TBL16	TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE 16	1.5	22	UCCUGGGAUUGCUGACGUACC	GGUACAUCAGCAAUCCUAGGA	Cleavage
miRseq41	Glyma.09G143200.1	AT-HSFB2A,HSFB2A	heat shock transcription factor B2A	1.5	21	CCUCCACAAGCUCCACCACCU	AGGUGUGGAGAUUGUGGAGG	Translation
miRseq41	Glyma.01G244900.1	ATPREP2,PREP2	presequence protease 2	1.5	21	CCUCCACAAGCUCCACCACCU	UAGUGUGGAGCUUAUUGGAGG	Cleavage
miRseq42	Glyma.07G147700.1	AtTLP1,TLP1	tubby like protein 1	1.5	22	AUUGUCCACUGCUUUGCCUGAG	CUCAGGCAAAGCGUGGACAAC	Cleavage
miRseq54	Glyma.13G227700.1	AtRLP51,RLP51	receptor like protein 51	1.5	21	AUUUUUCACACAUCCCCACCGU	UUGGUGGGGAUGUGUGGAAAA	Cleavage
miRseq70	Glyma.15G031900.2	EMB3011	RNA helicase family protein	1.5	22	UAUGGAUCCUGCAAACUUGGUA	CUGCAAGUUUGUAGGGUUCUAU	Cleavage
miRseq70	Glyma.15G031900.1	EMB3011	RNA helicase family protein	1.5	22	UAUGGAUCCUGCAAACUUGGUA	CUGCAAGUUUGUAGGGUUCUAU	Cleavage
miRseq74	Glyma.12G006400.1	SMC6A	structural maintenance of chromosomes 6A	1.5	22	UAAUGGAAAAAGUUGAGGGAC	UUGCUUCAUUUUUUUUUCAUUA	Cleavage
miRseq74	Glyma.12G006400.4	SMC6A	structural maintenance of chromosomes 6A	1.5	22	UAAUGGAAAAAGUUGAGGGAC	UUGCUUCAUUUUUUUUUCAUUA	Cleavage
miRseq74	Glyma.12G006400.9	SMC6A	structural maintenance of chromosomes 6A	1.5	22	UAAUGGAAAAAGUUGAGGGAC	UUGCUUCAUUUUUUUUUCAUUA	Cleavage
miRseq74	Glyma.12G006400.7	SMC6A	structural maintenance of chromosomes 6A	1.5	22	UAAUGGAAAAAGUUGAGGGAC	UUGCUUCAUUUUUUUUUCAUUA	Cleavage
miRseq74	Glyma.12G006400.5	SMC6A	structural maintenance of chromosomes 6A	1.5	22	UAAUGGAAAAAGUUGAGGGAC	UUGCUUCAUUUUUUUUUCAUUA	Cleavage
miRseq74	Glyma.12G006400.8	SMC6A	structural maintenance of chromosomes 6A	1.5	22	UAAUGGAAAAAGUUGAGGGAC	UUGCUUCAUUUUUUUUUCAUUA	Cleavage
miRseq74	Glyma.12G006400.2	SMC6A	structural maintenance of chromosomes 6A	1.5	22	UAAUGGAAAAAGUUGAGGGAC	UUGCUUCAUUUUUUUUUCAUUA	Cleavage
miRseq74	Glyma.12G006400.6	SMC6A	structural maintenance of chromosomes 6A	1.5	22	UAAUGGAAAAAGUUGAGGGAC	UUGCUUCAUUUUUUUUUCAUUA	Cleavage
miRseq74	Glyma.12G006400.3	SMC6A	structural maintenance of chromosomes 6A	1.5	22	UAAUGGAAAAAGUUGAGGGAC	UUGCUUCAUUUUUUUUUCAUUA	Cleavage
miRseq76	Glyma.08G001100.1	TBL16	TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE 16	1.5	22	UUCUGGGGAUUGCUGACGUAC	GUACAUCAGCAAUCCUAGGAA	Cleavage
miRseq77	Glyma.09G046800.1	ATSNF4,SNF4	homolog of yeast sucrose nonfermenting 4	1.5	22	AGGACGAAAAACAAAACAACA	UAUUUCUUUUGUUUUUCGUCUU	Cleavage
miRseq77	Glyma.09G046800.4	ATSNF4,SNF4	homolog of yeast sucrose nonfermenting 4	1.5	22	AGGACGAAAAACAAAACAACA	UAUUUCUUUUGUUUUUCGUCUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.15G019200.1	ABC36,ATABC36,ATPDR8,PDR8,PEN3	ABC-2 and Plant PDR ABC-type transporter family protein	1.5	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	AUGUUCAGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.15G019200.5	ABC36,ATABC36,ATPDR8,PDR8,PEN3	ABC-2 and Plant PDR ABC-type transporter family protein	1.5	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	AUGUUCAGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.15G019200.2	ABC36,ATABC36,ATPDR8,PDR8,PEN3	ABC-2 and Plant PDR ABC-type transporter family protein	1.5	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	AUGUUCAGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.15G019200.4	ABC36,ATABC36,ATPDR8,PDR8,PEN3	ABC-2 and Plant PDR ABC-type transporter family protein	1.5	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	AUGUUCAGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.15G019200.3	ABC36,ATABC36,ATPDR8,PDR8,PEN3	ABC-2 and Plant PDR ABC-type transporter family protein	1.5	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	AUGUUCAGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.15G019200.6	ABC36,ATABC36,ATPDR8,PDR8,PEN3	ABC-2 and Plant PDR ABC-type transporter family protein	1.5	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	AUGUUCAGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.11G138300.1	ATGRAS2,GRAS2,SCL14	SCARECROW-like 14	1.5	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	AUGUUCAGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.11G184400.1	AXS2	UDP-D-apiose/UDP-D-xylose synthase 2	1.5	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	AGAUUCAGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.15G226800.1	CRK10,RLK4	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 10	1.5	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	CUUCCAGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.14G058500.1	ESK1,TBL29	Plant protein of unknown function (DUF828)	1.5	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	UGUUUCAGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.06G052000.1	ATIRT3,IRT3	iron regulated transporter 3	1.5	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	UCUUUUAGUUUUUUUCUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.17G241800.1	AtTHO5,THO5	THO complex, subunit 5	1.5	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	AUAUCUAGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.17G241800.2	AtTHO5,THO5	THO complex, subunit 5	1.5	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	AUAUCUAGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.07G023500.1	CIPK25,SnRK3.25	CBL-interacting protein kinase 25	1.5	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	CCCUUCAUUUUUUUUUCUUCUU	Cleavage
miRseq10	Glyma.13G295200.1	SOM	Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type family protein	2.0	22	UAGGGAAACUUGCUGCUGCUU	AAGUAGUAGCAGAGUUCCUUA	Cleavage
miRseq10	Glyma.04G192000.4	REF6	relative of early flowering 6	2.0	22	UAGGGAAACUUGCUGCUGCUU	AAGCAGCAGCAAAGAUUCCUA	Cleavage
miRseq10	Glyma.04G192000.3	REF6	relative of early flowering 6	2.0	22	UAGGGAAACUUGCUGCUGCUU	AAGCAGCAGCAAAGAUUCCUA	Cleavage
miRseq10	Glyma.04G192000.1	REF6	relative of early flowering 6	2.0	22	UAGGGAAACUUGCUGCUGCUU	AAGCAGCAGCAAAGAUUCCUA	Cleavage
miRseq10	Glyma.04G192000.2	REF6	relative of early flowering 6	2.0	22	UAGGGAAACUUGCUGCUGCUU	AAGCAGCAGCAAAGAUUCCUA	Cleavage
miRseq100	Glyma.07G163700.2	REM39,VRN1	AP2/B3-like transcriptional factor family protein	2.0	21	AGUUCUGUUGUCUGCUCUUUG	AAGAAAGCAGACAACAGAAUU	Cleavage
miRseq100	Glyma.01G055700.2	ATBOR4,BOR4	HCO3- transporter family	2.0	21	AGUUCUGUUGUCUGCUCUUUG	UGAAGAUAGACAACAGAAACA	Cleavage
miRseq100	Glyma.07G163700.1	REM39,VRN1	AP2/B3-like transcriptional factor family protein	2.0	21	AGUUCUGUUGUCUGCUCUUUG	AAGAAAGCAGACAACAGAAUU	Cleavage
miRseq100	Glyma.01G055700.1	ATBOR4,BOR4	HCO3- transporter family	2.0	21	AGUUCUGUUGUCUGCUCUUUG	UGAAGAUAGACAACAGAAACA	Cleavage
miRseq100	Glyma.07G163700.3	REM39,VRN1	AP2/B3-like transcriptional factor family protein	2.0	21	AGUUCUGUUGUCUGCUCUUUG	AAGAAAGCAGACAACAGAAUU	Cleavage
miRseq105	Glyma.15G074200.2	ATUBC24,PHO2,UBC24	phosphate 2	2.0	22	CUUCGUCAUGAUUGUUUGCCU	UGGAAAGACAAUCAUGAUGAAG	Cleavage
miRseq105	Glyma.15G074200.3	ATUBC24,PHO2,UBC24	phosphate 2	2.0	22	CUUCGUCAUGAUUGUUUGCCU	UGGAAAGACAAUCAUGAUGAAG	Cleavage
miRseq105	Glyma.13G239100.1	ATUBC24,PHO2,UBC24	phosphate 2	2.0	22	CUUCGUCAUGAUUGUUUGCCU	UGGAAAGACAAUCAUGAUGAAG	Cleavage
miRseq105	Glyma.15G074200.1	ATUBC24,PHO2,UBC24	phosphate 2	2.0	22	CUUCGUCAUGAUUGUUUGCCU	UGGAAAGACAAUCAUGAUGAAG	Cleavage
miRseq105	Glyma.17G031800.1	AAE7,ACN1	acyl-activating enzyme 7	2.0	22	CUUCGUCAUGAUUGUUUGCCU	UAUUGAAAUGAUCAUGACGAAG	Cleavage

miRseq11	Glyma.03G220900.3	FCA	RNA binding;abscisic acid binding	2.0	22	CGAGGACUAAAAUUUGAAUUUU	UGAAUGCAAUUUUGGUCCUUG	Cleavage
miRseq11	Glyma.03G220900.5	FCA	RNA binding;abscisic acid binding	2.0	22	CGAGGACUAAAAUUUGAAUUUU	UGAAUGCAAUUUUGGUCCUUG	Cleavage
miRseq11	Glyma.03G220900.4	FCA	RNA binding;abscisic acid binding	2.0	22	CGAGGACUAAAAUUUGAAUUUU	UGAAUGCAAUUUUGGUCCUUG	Cleavage
miRseq11	Glyma.03G220900.1	FCA	RNA binding;abscisic acid binding	2.0	22	CGAGGACUAAAAUUUGAAUUUU	UGAAUGCAAUUUUGGUCCUUG	Cleavage
miRseq11	Glyma.03G220900.2	FCA	RNA binding;abscisic acid binding	2.0	22	CGAGGACUAAAAUUUGAAUUUU	UGAAUGCAAUUUUGGUCCUUG	Cleavage
miRseq11	Glyma.03G220900.6	FCA	RNA binding;abscisic acid binding	2.0	22	CGAGGACUAAAAUUUGAAUUUU	UGAAUGCAAUUUUGGUCCUUG	Cleavage
miRseq113	Glyma.08G065100.2	HSC70-5, MTHSC70-2	mitochondrial HSO70 2	2.0	21	AAUUGGAAAAAGUGAGGCACG	CUUGUUUCACUUUUCCAUC	Cleavage
miRseq113	Glyma.08G065100.1	HSC70-5, MTHSC70-2	mitochondrial HSO70 2	2.0	21	AAUUGGAAAAAGUGAGGCACG	CUUGUUUCACUUUUCCAUC	Cleavage
miRseq114	Glyma.19G061600.2	AtMYB24, MYB24	myb domain protein 24	2.0	21	AUAUUUCUUGGUAGCUGGGCC	CACCCAGUUUAUCAAAGAAUGU	Cleavage
miRseq114	Glyma.19G061600.1	AtMYB24, MYB24	myb domain protein 24	2.0	21	AUAUUUCUUGGUAGCUGGGCC	CACCCAGUUUAUCAAAGAAUGU	Cleavage
miRseq114	Glyma.13G305000.1	ATXR3, SDG2	SET domain protein 2	2.0	21	AUAUUUCUUGGUAGCUGGGCC	CCUCCAGUUACUAGGAAAUU	Cleavage
miRseq116	Glyma.17G022300.3	CHR3, SYD	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	2.0	21	UGAAGAACGAGAACAGCCCU	GAGGGAUGUUCUUGUUCUUCG	Cleavage
miRseq116	Glyma.17G022300.2	CHR3, SYD	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	2.0	21	UGAAGAACGAGAACAGCCCU	GAGGGAUGUUCUUGUUCUUCG	Cleavage
miRseq116	Glyma.17G022300.1	CHR3, SYD	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	2.0	21	UGAAGAACGAGAACAGCCCU	GAGGGAUGUUCUUGUUCUUCG	Cleavage
miRseq116	Glyma.07G252100.1	CHR3, SYD	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	2.0	21	UGAAGAACGAGAACAGCCCU	GAGGGAUGUUCUUGUUCUUCG	Cleavage
miRseq117	Glyma.15G246500.1	EMB3012	embryo defective 3012	2.0	21	AGAGGACCGAUGUAGAAUGAU	UGCAUUCUACAUCGGUUCUUAU	Cleavage
miRseq117	Glyma.20G074700.1	ATZW10	centromere/kinetochore protein, putative (ZW10)	2.0	21	AGAGGACCGAUGUAGAAUGAU	AGCAUUCUACAUCGGUUCUUAU	Cleavage
miRseq119	Glyma.06G213300.2	AGO10, PNH, ZLL	Stabilizer of iron transporter SufD / Polynucleotidyl transferase	2.0	21	AUUCUUCUGAGUAGAUUCUGC	UAAGGCCUACUCAGAUUGGGAU	Cleavage
miRseq119	Glyma.06G213300.4	AGO10, PNH, ZLL	Stabilizer of iron transporter SufD / Polynucleotidyl transferase	2.0	21	AUUCUUCUGAGUAGAUUCUGC	UAAGGCCUACUCAGAUUGGGAU	Cleavage
miRseq119	Glyma.06G213300.3	AGO10, PNH, ZLL	Stabilizer of iron transporter SufD / Polynucleotidyl transferase	2.0	21	AUUCUUCUGAGUAGAUUCUGC	UAAGGCCUACUCAGAUUGGGAU	Cleavage
miRseq119	Glyma.04G150900.1	AGO10, PNH, ZLL	Stabilizer of iron transporter SufD / Polynucleotidyl transferase	2.0	21	AUUCUUCUGAGUAGAUUCUGC	UAAGGCCUACUCAGAUUGGGAU	Cleavage
miRseq119	Glyma.06G213300.1	AGO10, PNH, ZLL	Stabilizer of iron transporter SufD / Polynucleotidyl transferase	2.0	21	AUUCUUCUGAGUAGAUUCUGC	UAAGGCCUACUCAGAUUGGGAU	Cleavage
miRseq122	Glyma.18G219300.2	CRK25	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 25	2.0	21	ACGAUGUAUAACUUUGGCUCC	CGACUUAAGUUUAUACAUCGU	Cleavage
miRseq122	Glyma.18G219300.1	CRK25	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 25	2.0	21	ACGAUGUAUAACUUUGGCUCC	CGACUUAAGUUUAUACAUCGU	Cleavage
miRseq122	Glyma.18G219800.2	CRK23	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 23	2.0	21	ACGAUGUAUAACUUUGGCUCC	CGACUUAAGUUUAUACAUCGU	Cleavage
miRseq122	Glyma.18G219200.1	CRK25	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 25	2.0	21	ACGAUGUAUAACUUUGGCUCC	CGACUUAAGUUUAUACAUCGU	Cleavage
miRseq122	Glyma.18G219800.1	CRK23	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 23	2.0	21	ACGAUGUAUAACUUUGGCUCC	CGACUUAAGUUUAUACAUCGU	Cleavage
miRseq122	Glyma.20G137400.1	CRK25	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 25	2.0	21	ACGAUGUAUAACUUUGGCUCC	CGACUUAAGUUUAUACAUCGU	Cleavage
miRseq122	Glyma.18G294400.2	CRK5, RLK6	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 5	2.0	21	ACGAUGUAUAACUUUGGCUCC	ACACUUAAGUUUAUACAUCGU	Cleavage
miRseq122	Glyma.18G294400.1	CRK5, RLK6	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 5	2.0	21	ACGAUGUAUAACUUUGGCUCC	ACACUUAAGUUUAUACAUCGU	Cleavage
miRseq122	Glyma.18G294400.3	CRK5, RLK6	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 5	2.0	21	ACGAUGUAUAACUUUGGCUCC	ACACUUAAGUUUAUACAUCGU	Cleavage
miRseq127	Glyma.11G195900.1	CH-CPN60A, CPN60A, SLP	chaperonin-60alpha	2.0	22	ACGGAUUGAGGCGAGAAUGGC	GGUAUUCUCGCCUCAAUUUGU	Cleavage
miRseq127	Glyma.11G195900.3	CH-CPN60A, CPN60A, SLP	chaperonin-60alpha	2.0	22	ACGGAUUGAGGCGAGAAUGGC	GGUAUUCUCGCCUCAAUUUGU	Cleavage
miRseq127	Glyma.12G078100.1	CH-CPN60A, CPN60A, SLP	chaperonin-60alpha	2.0	22	ACGGAUUGAGGCGAGAAUGGC	GGUAUUCUCGCCUCAAUUUGU	Cleavage
miRseq127	Glyma.11G195900.2	CH-CPN60A, CPN60A, SLP	chaperonin-60alpha	2.0	22	ACGGAUUGAGGCGAGAAUGGC	GGUAUUCUCGCCUCAAUUUGU	Cleavage
miRseq132	Glyma.17G226300.1	ATXI-I, XI-15, XI-I	myosin, putative	2.0	21	AAGAUGGAGAAGCAGGGCACG	GGGGCUCUGCUUCUCAAUUUU	Cleavage
miRseq132	Glyma.11G174100.1	FAD8	fatty acid desaturase 8	2.0	21	AAGAUGGAGAAGCAGGGCACG	CUUUCUCUGCUUCUUAUCUUAU	Cleavage
miRseq136	Glyma.16G025300.1	ATCNGC1, CNGC1	cyclic nucleotide gated channel 1	2.0	22	UUUUUAUACAGUUGAUGGCU	CAGCAACAGCAGUGUGUAAAAA	Cleavage
miRseq137	Glyma.10G203500.1	CYP76C1	cytochrome P450, family 76, subfamily C, polypeptide 1	2.0	22	UAUGUUGGUAGGAAAACUCUG	UAGAGUUGUUCUUAUACAUA	Cleavage
miRseq137	Glyma.20G223800.1	NDL1	N-MYC downregulated-like 1	2.0	22	UAUGUUGGUAGGAAAACUCUG	GGGUGUUUUCCUACCAUUGUA	Cleavage
miRseq137	Glyma.20G223800.2	NDL1	N-MYC downregulated-like 1	2.0	22	UAUGUUGGUAGGAAAACUCUG	GGGUGUUUUCCUACCAUUGUA	Cleavage
miRseq14	Glyma.18G219300.2	CRK25	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 25	2.0	21	CGAUGUAUAACUUUGGCUCCA	UCGACUUAAGUUUAUACAUCG	Cleavage
miRseq14	Glyma.18G219300.1	CRK25	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 25	2.0	21	CGAUGUAUAACUUUGGCUCCA	UCGACUUAAGUUUAUACAUCG	Cleavage
miRseq14	Glyma.18G219800.2	CRK23	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 23	2.0	21	CGAUGUAUAACUUUGGCUCCA	UCGACUUAAGUUUAUACAUCG	Cleavage
miRseq14	Glyma.18G219200.1	CRK25	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 25	2.0	21	CGAUGUAUAACUUUGGCUCCA	UCGACUUAAGUUUAUACAUCG	Cleavage
miRseq14	Glyma.18G219800.1	CRK23	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 23	2.0	21	CGAUGUAUAACUUUGGCUCCA	UCGACUUAAGUUUAUACAUCG	Cleavage
miRseq14	Glyma.20G137400.1	CRK25	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 25	2.0	21	CGAUGUAUAACUUUGGCUCCA	UCGACUUAAGUUUAUACAUCG	Cleavage
miRseq15	Glyma.16G165800.1	LHB1B1, LHCB1.4	light-harvesting chlorophyll-protein complex II subunit B1	2.0	21	AGAGAUGUAUGGAGUGAGAGA	UGUCUCACUUAUACAUCUUAU	Cleavage
miRseq152	Glyma.16G021200.1	CYP78A6	cytochrome P450, family 78, subfamily A, polypeptide 6	2.0	22	AGUGAUGGCCACGCGGGCUCUC	GUGGGCCCGUUGGCAUCACU	Cleavage
miRseq154	Glyma.16G033700.2	UGT73B4	UDP-glycosyltransferase 73B4	2.0	21	CGAGAUCCGCGAGGCGUGUGC	UAAACAGCUUCGCCAUCUCG	Cleavage
miRseq154	Glyma.16G033700.1	UGT73B4	UDP-glycosyltransferase 73B4	2.0	21	CGAGAUCCGCGAGGCGUGUGC	UAAACAGCUUCGCCAUCUCG	Cleavage
miRseq169	Glyma.19G131000.1	BOP2	Ankyrin repeat family protein / BTB/POZ domain-containing protein	2.0	22	CGAGGAGGACUUGAUUUUGAUG	UGGCAAAAUCAGGUCUUCUCC	Cleavage
miRseq169	Glyma.06G086600.1	ATHB-8, ATHB8, HB-8	homeobox gene 8	2.0	22	CGAGGAGGACUUGAUUUUGAUG	GUCCAAAACCAAGUUCUCUUCG	Cleavage
miRseq174	Glyma.03G007500.1	AtMYB117, LOF1, MYB117	myb domain protein 117	2.0	21	ACACGACUAGGGUGCUCUGGU	GAGGGAGCACUCUAGUCUGUGU	Cleavage
miRseq179	Glyma.13G372700.1	MED8	mediator subunit 8	2.0	22	CGGAGGAUUUGUUGGUUGAUGC	CUAUAACCAACAAUCCGUCG	Cleavage

miRseq179	Glyma.07G130700.1	ATPRK2A,PRK2A	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	2.0	22	CGGAGGAUUUGUUGGUUGAUGC	CUUCAAACAACAAGUUCUCG	Cleavage
miRseq180	Glyma.11G077300.2	CPK28	calcium-dependent protein kinase 28	2.0	22	GGUCAAGGAGAUUUUGUUGGC	AUUCAAAAAGUCUCUUUGACC	Cleavage
miRseq180	Glyma.11G077300.1	CPK28	calcium-dependent protein kinase 28	2.0	22	GGUCAAGGAGAUUUUGUUGGC	AUUCAAAAAGUCUCUUUGACC	Cleavage
miRseq185	Glyma.06G044300.1	APUM7,PUM7	pumilio 7	2.0	22	UAUUUGGAUUGUGGAGUGGGUG	GAGUUGCUCCACAAUCCAAUG	Cleavage
miRseq19	Glyma.07G036200.1	ATHAP2C,HAP2C,NF-YA3	nuclear factor Y, subunit A3	2.0	22	AUGAGAAGCAAAGUUAUGGGUG	UGCCUAUAACUUGUUUCUUGU	Cleavage
miRseq19	Glyma.07G036200.12	ATHAP2C,HAP2C,NF-YA3	nuclear factor Y, subunit A3	2.0	22	AUGAGAAGCAAAGUUAUGGGUG	UGCCUAUAACUUGUUUCUUGU	Cleavage
miRseq190	Glyma.03G201200.1	ATNHL10,NHL10,YLS9	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	2.0	22	AUCAUGUUGUUGUGAAGGGGUC	ACACCCUUCACUACAACAUGGU	Translation
miRseq190	Glyma.03G201100.1	ATNHL10,NHL10,YLS9	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	2.0	22	AUCAUGUUGUUGUGAAGGGGUC	ACACCCUUCACUACAACAUGGU	Translation
miRseq190	Glyma.03G201500.1	ATNHL10,NHL10,YLS9	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	2.0	22	AUCAUGUUGUUGUGAAGGGGUC	ACACCCUUCACUACAACAUGGU	Translation
miRseq196	Glyma.09G242000.1	CAT9	cationic amino acid transporter 9	2.0	21	CCGAGGUUGAAUGUGGAGAU	GGUCUCUACGUUCAGUCUCGG	Cleavage
miRseq196	Glyma.08G178400.2	ATMBD8,MBD8	methyl-CPG-binding domain 8	2.0	21	CCGAGGUUGAAUGUGGAGAU	UCUCUCCACAUUCGACCUCCG	Cleavage
miRseq196	Glyma.08G178400.1	ATMBD8,MBD8	methyl-CPG-binding domain 8	2.0	21	CCGAGGUUGAAUGUGGAGAU	UCUCUCCACAUUCGACCUCCG	Cleavage
miRseq2	Glyma.15G029200.1	ETFQO	electron-transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase	2.0	22	CAUGUUGUUGUGAAGGGGUCAU	CCAAUCCUUCACAGCAACAUCU	Cleavage
miRseq2	Glyma.03G236600.1	MGP	C2H2 and C2HC zinc fingers superfamily protein	2.0	22	CAUGUUGUUGUGAAGGGGUCAU	AAAACCCUUUAACAACAACAU	Cleavage
miRseq205	Glyma.02G272800.1	ATBPM4,BPM4	BTB-POZ and MATH domain 4	2.0	21	AUUUUGCGAAUUGAGGGACU	AAUUCUCAGAUUCGCAAAA	Cleavage
miRseq21	Glyma.03G066100.1	RPL10C,SAG24	senescence associated gene 24	2.0	22	UAAGUCGGACCGAGCAUUUCU	ACAAAUGCUAGGUCUGACUUA	Cleavage
miRseq210	Glyma.15G025500.1	ATMYB26,MS35,MYB26	myb domain protein 26	2.0	22	UGGCGGAAGAAGAAUCUGGACU	AUUCCAUUAUCUUCUUCUGCUA	Cleavage
miRseq212	Glyma.11G061300.1	MSP-1,OEE33,OEE1,OEE33,PSBO-1,PSBO1	PS II oxygen-evolving complex 1	2.0	22	UAGAGGAUCAAAGGUUUGGCU	AAUAAAUUUUUUGGUCCUCA	Cleavage
miRseq226	Glyma.13G295200.1	SOM	Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type family protein	2.0	21	UAGGAAACUUGUCUGCGCU	AGUAGUAGCAGAGUUUCUUA	Cleavage
miRseq226	Glyma.04G192000.4	REF6	relative of early flowering 6	2.0	21	UAGGAAACUUGUCUGCGCU	AGCAGCAGCAAAGAUUUCUA	Cleavage
miRseq226	Glyma.04G192000.3	REF6	relative of early flowering 6	2.0	21	UAGGAAACUUGUCUGCGCU	AGCAGCAGCAAAGAUUUCUA	Cleavage
miRseq226	Glyma.04G192000.1	REF6	relative of early flowering 6	2.0	21	UAGGAAACUUGUCUGCGCU	AGCAGCAGCAAAGAUUUCUA	Cleavage
miRseq226	Glyma.04G192000.2	REF6	relative of early flowering 6	2.0	21	UAGGAAACUUGUCUGCGCU	AGCAGCAGCAAAGAUUUCUA	Cleavage
miRseq28	Glyma.08G286700.1	BETA CA2,CA18,CA2	carbonic anhydrase 2	2.0	22	AGGAAUUCUGAUGUGUAUGGA	AGCAAACAUAUAGAAUUCUCU	Cleavage
miRseq28	Glyma.16G042900.1	ANAC087	Arabidopsis NAC domain containing protein 87	2.0	22	AGGAAUUCUGAUGUGUAUGGA	UGUAUACAUAUAGAAUUCUCU	Cleavage
miRseq34	Glyma.11G087200.1	ATIRE1-2,IRE1-2,IRE1A	Endoribonuclease/protein kinase IRE1-like	2.0	22	AUAAGGGGAAGAUUGAGGCGCU	CGUUUUAUAUCUUCUCUUAU	Cleavage
miRseq34	Glyma.09G105000.1	PP2A-4	protein phosphatase 2A-4	2.0	22	AUAAGGGGAAGAUUGAGGCGCU	AGGGUUUCGAUUUUCUUUAU	Cleavage
miRseq34	Glyma.09G105000.2	PP2A-4	protein phosphatase 2A-4	2.0	22	AUAAGGGGAAGAUUGAGGCGCU	AGGGUUUCGAUUUUCUUUAU	Cleavage
miRseq37	Glyma.19G203700.1	UBP13	ubiquitin-specific protease 13	2.0	21	CACGUCUCUCCUUUCCAGC	UUUGAAAGAGGAGAGUACGUG	Cleavage
miRseq41	Glyma.12G234200.3	ATTPS1,TPS1	trehalose-6-phosphate synthase	2.0	21	CCUCCACAAGCUCCACCACCU	AUGUGUGGAGUUUGUGGAUG	Cleavage
miRseq44	Glyma.10G210500.1	GATA9	GATA transcription factor 9	2.0	21	CAAACAUGAGAAUAGCGGCC	UGCCAAUAUUUCUUAUGUUUG	Cleavage
miRseq47	Glyma.07G147700.1	AtTLP1,TLP1	tubby like protein 1	2.0	22	UCAGUCAUUGUGUUCGCGCU	AGCGGACACCAUAUUAUGA	Cleavage
miRseq48	Glyma.06G242100.1	SPA3	SPA1-related 3	2.0	21	AGAGGUGUAUGGAGUGAGAGA	UUUCUCUCUCCAUUAUUCUCU	Cleavage
miRseq48	Glyma.06G242100.3	SPA3	SPA1-related 3	2.0	21	AGAGGUGUAUGGAGUGAGAGA	UUUCUCUCUCCAUUAUUCUCU	Cleavage
miRseq51	Glyma.03G013500.1	ATROPGEF3,ROPGEF3	RHO guanyl-nucleotide exchange factor 3	2.0	21	AAGGUAUGUAACAGUUUA	AAUGCUUUGUUAAGCAACCCU	Cleavage
miRseq54	Glyma.13G110300.4	ORG4	OBP3-responsive gene 4	2.0	21	AUUUUCACACAUCCCACCGU	GGUGUGGGGUGUGUGGAAU	Cleavage
miRseq54	Glyma.13G110300.3	ORG4	OBP3-responsive gene 4	2.0	21	AUUUUCACACAUCCCACCGU	GGUGUGGGGUGUGUGGAAU	Cleavage
miRseq54	Glyma.13G110300.2	ORG4	OBP3-responsive gene 4	2.0	21	AUUUUCACACAUCCCACCGU	GGUGUGGGGUGUGUGGAAU	Cleavage
miRseq54	Glyma.13G110300.1	ORG4	OBP3-responsive gene 4	2.0	21	AUUUUCACACAUCCCACCGU	GGUGUGGGGUGUGUGGAAU	Cleavage
miRseq57	Glyma.01G068200.1	ATSRG1,SRG1	senescence-related gene 1	2.0	22	UUUGGGGAGGAUGGUGCGUGG	GCUCUCCAUCCUCCUCCAAAG	Cleavage
miRseq57	Glyma.01G068200.2	ATSRG1,SRG1	senescence-related gene 1	2.0	22	UUUGGGGAGGAUGGUGCGUGG	GCUCUCCAUCCUCCUCCAAAG	Cleavage
miRseq58	Glyma.13G025500.1	ATWEE1,WEE1	WEE1 kinase homolog	2.0	22	UUGGAUUUUUGAUUCUGGUGCC	AGAACCAGAAUCAGAAUUCAG	Cleavage
miRseq58	Glyma.05G101700.1	ATNRAMP3,NRAMP3	natural resistance-associated macrophage protein 3	2.0	22	UUGGAUUUUUGAUUCUGGUGCC	CCAACCAGAAUCAGAAUCCAA	Translation
miRseq59	Glyma.05G051500.2	SDD1	Subtilase family protein	2.0	22	UUGAUUGUUCUAUCUGCACUUC	UCAUUGCAGGUAGAACAUAUA	Cleavage
miRseq59	Glyma.05G051500.1	SDD1	Subtilase family protein	2.0	22	UUGAUUGUUCUAUCUGCACUUC	UCAUUGCAGGUAGAACAUAUA	Cleavage
miRseq60	Glyma.08G032900.1	AtHsp90.2,ERD8,HSP81-2,HSP90.2	heat shock protein 81-2	2.0	22	UUCUGUGAAUUCUUGGACAAA	UGGGACCAAGGAAUUAUGGAA	Cleavage
miRseq60	Glyma.08G032900.3	AtHsp90.2,ERD8,HSP81-2,HSP90.2	heat shock protein 81-2	2.0	22	UUCUGUGAAUUCUUGGACAAA	UGGGACCAAGGAAUUAUGGAA	Cleavage
miRseq60	Glyma.08G032900.4	AtHsp90.2,ERD8,HSP81-2,HSP90.2	heat shock protein 81-2	2.0	22	UUCUGUGAAUUCUUGGACAAA	UGGGACCAAGGAAUUAUGGAA	Cleavage
miRseq60	Glyma.02G302500.1	AtHsp90.4,Hsp81.4	HEAT SHOCK PROTEIN 81.4	2.0	22	UUCUGUGAAUUCUUGGACAAA	UGGGACCAAGGAAUUAUGGAA	Cleavage
miRseq60	Glyma.08G032900.2	AtHsp90.2,ERD8,HSP81-2,HSP90.2	heat shock protein 81-2	2.0	22	UUCUGUGAAUUCUUGGACAAA	UGGGACCAAGGAAUUAUGGAA	Cleavage
miRseq60	Glyma.14G011600.1	AtHsp90.4,Hsp81.4	HEAT SHOCK PROTEIN 81.4	2.0	22	UUCUGUGAAUUCUUGGACAAA	UGGGACCAAGGAAUUAUGGAA	Cleavage
miRseq62	Glyma.03G253300.2	U1A	spliceosomal protein U1A	2.0	22	UCAUCGAGUUGGAGCAUGGCU	UGUCAUGCUUUUGUCUGAUGA	Cleavage
miRseq62	Glyma.03G253300.1	U1A	spliceosomal protein U1A	2.0	22	UCAUCGAGUUGGAGCAUGGCU	UGUCAUGCUUUUGUCUGAUGA	Cleavage
miRseq64	Glyma.02G190600.4	EMB2776,LIS	WD-40 repeat family protein / small nuclear ribonucleoprotein Prp4p-related	2.0	22	GAAUUGCAUUCUCUCAAAGGGC	UAUUUUUGAGGGGGAUGCAUUU	Cleavage
miRseq64	Glyma.02G190600.3	EMB2776,LIS	WD-40 repeat family protein / small nuclear ribonucleoprotein Prp4p-related	2.0	22	GAAUUGCAUUCUCUCAAAGGGC	UAUUUUUGAGGGGGAUGCAUUU	Cleavage

miRseq64	Glyma.02G190600.2	EMB2776,LIS	WD-40 repeat family protein / small nuclear ribonucleoprotein Prp4p-related	2.0	22	GAAUUGCAUUCUCUCAAGGGC	UAUUUUUAGGGGGAUGCAAUUU	Cleavage
miRseq64	Glyma.02G190600.1	EMB2776,LIS	WD-40 repeat family protein / small nuclear ribonucleoprotein Prp4p-related	2.0	22	GAAUUGCAUUCUCUCAAGGGC	UAUUUUUAGGGGGAUGCAAUUU	Cleavage
miRseq68	Glyma.19G071300.2	GHS1	Ribosomal protein S21 family protein	2.0	22	AGGACUAAAAGUAAAAGCACU	UUUUUUUUUUUUUUUAGUCCU	Cleavage
miRseq68	Glyma.19G071300.1	GHS1	Ribosomal protein S21 family protein	2.0	22	AGGACUAAAAGUAAAAGCACU	UUUUUUUUUUUUUUUAGUCCU	Cleavage
miRseq68	Glyma.16G204600.1	ENO2,LOS2	Enolase	2.0	22	AGGACUAAAAGUAAAAGCACU	CUGGCUUUUUAGUUUUAGUUCU	Translation
miRseq68	Glyma.16G204600.2	ENO2,LOS2	Enolase	2.0	22	AGGACUAAAAGUAAAAGCACU	CUGGCUUUUUAGUUUUAGUUCU	Translation
miRseq70	Glyma.02G240500.1	anac028,NAC028	NAC domain containing protein 28	2.0	22	UAUGGAUCCUGCAAACUUGGUA	AUUCAGGCUUGCAGGAUUCUAU	Cleavage
miRseq74	Glyma.10G290900.2	ATHEX2,HEXO1	beta-hexosaminidase 1	2.0	22	UAAUGGAAAAAGUUGAGGGAC	AUUCUCAUUUUUUUCCCUUA	Cleavage
miRseq77	Glyma.13G151900.1	HRD	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	2.0	22	AGGACGAAAAACAACAACA	UUUUUUUUUUUUUUUUUUUCC	Cleavage
miRseq77	Glyma.14G090800.1	emb1273	embryo defective 1273	2.0	22	AGGACGAAAAACAACAACA	CUCUUGUUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq79	Glyma.13G294100.1	HSL1	HAESA-like 1	2.0	22	UUUGGCUUGGAGGAUGAACCCU	CCUCUCCUCCUCCAAGCCAAA	Cleavage
miRseq87	Glyma.18G195200.4	AtRLP13,RLP13	receptor like protein 13	2.0	21	CCUGGGCUGGAGAUUUGGUCG	UCACCAAUCUCCAUCUCAGG	Cleavage
miRseq87	Glyma.18G195200.5	AtRLP13,RLP13	receptor like protein 13	2.0	21	CCUGGGCUGGAGAUUUGGUCG	UCACCAAUCUCCAUCUCAGG	Cleavage
miRseq87	Glyma.18G195200.2	AtRLP13,RLP13	receptor like protein 13	2.0	21	CCUGGGCUGGAGAUUUGGUCG	UCACCAAUCUCCAUCUCAGG	Cleavage
miRseq87	Glyma.18G195200.3	AtRLP13,RLP13	receptor like protein 13	2.0	21	CCUGGGCUGGAGAUUUGGUCG	UCACCAAUCUCCAUCUCAGG	Cleavage
miRseq89	Glyma.04G087000.2	PTAC6	plastid transcriptionally active 6	2.0	21	UCUCUCUGAAUUCUUGACCU	AUGUCUACGAUUUCAGAGAGA	Cleavage
miRseq89	Glyma.04G087000.1	PTAC6	plastid transcriptionally active 6	2.0	21	UCUCUCUGAAUUCUUGACCU	AUGUCUACGAUUUCAGAGAGA	Cleavage
miRseq91	Glyma.03G128600.1	BOP2	Ankyrin repeat family protein / BTB/POZ domain-containing protein	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	CGGUUCAUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.08G230600.1	ATRD22,RD22	BURP domain-containing protein	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	AUGUUUAGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.01G157500.1	ATMLO8,MLO8	Seven transmembrane MLO family protein	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	UAGUCUAGUCUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.07G128000.1	ACS7,ATACS7	1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase 7	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	GCGUUUAGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.03G168800.1	VIP5	plus-3 domain-containing protein	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	GGCUUUGGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.10G062600.1	UGT73D1	UDP-glucosyl transferase 73D1	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	ACGAUUAGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.13G281700.1	KIS,TFCA	tubulin folding cofactor A (KIESEL)	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	AAGUGCAGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.05G115000.2	ATGB2,ATRAB2C,ATRABB1B,GB2	GTP-binding 2	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	AGUGCCAGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.05G115000.1	ATGB2,ATRAB2C,ATRABB1B,GB2	GTP-binding 2	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	AGUGCCAGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.13G281700.2	KIS,TFCA	tubulin folding cofactor A (KIESEL)	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	AAGUGCAGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.11G136700.1	APUM2,PUM2	pumilio 2	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	GAGGGCAGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.18G280500.1	LINC1	little nuclei1	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	UUCUCUAGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.18G280500.2	LINC1	little nuclei1	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	UUCUCUAGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.18G280500.3	LINC1	little nuclei1	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	UUCUCUAGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.06G318400.1	ATPPA	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	UGUUCUGGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.06G318400.6	ATPPA	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	UGUUCUGGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.06G318400.3	ATPPA	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	UGUUCUGGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.06G318400.4	ATPPA	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	UGUUCUGGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.14G210700.1	AtUGP2,UGP2	UDP-glucose pyrophosphorylase 2	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	CGCGCCAGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.06G318400.2	ATPPA	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	UGUUCUGGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.06G318400.5	ATPPA	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	UGUUCUGGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.19G006400.1	ARFA1F,ATARFA1F	ADP-ribosylation factor A1F	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	UGUUCAGUUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.15G190200.1	SPL12	squamosa promoter-binding protein-like 12	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	UUUUCUGGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.11G251500.1	SPL2	squamosa promoter binding protein-like 2	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	GCCUCUGGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.11G251500.8	SPL2	squamosa promoter binding protein-like 2	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	GCCUCUGGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.11G251500.5	SPL2	squamosa promoter binding protein-like 2	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	GCCUCUGGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.11G251500.11	SPL2	squamosa promoter binding protein-like 2	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	GCCUCUGGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.11G251500.9	SPL2	squamosa promoter binding protein-like 2	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	GCCUCUGGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.11G251500.6	SPL2	squamosa promoter binding protein-like 2	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	GCCUCUGGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.11G251500.16	SPL2	squamosa promoter binding protein-like 2	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	GCCUCUGGUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.19G196500.1	emb2735	embryo defective 2735	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	ACCUUUAGUUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.15G171000.1	EDA39	calmodulin-binding family protein	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	GUCUUUAGUUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq91	Glyma.04G116500.4	AKR2B	ankyrin repeat-containing 2B	2.0	22	AAAGAAGAAAAAACUGGACCU	CCUUUUAGUUUUUUUUUUUUUUU	Cleavage
miRseq92	Glyma.15G025700.1	ATPP7,PP7	serine/threonine phosphatase 7	2.0	21	CUAUGUGAGCCGUAAGACCC	AGGUCUUGAUGGCUCACAGAG	Cleavage
miRseq92	Glyma.18G128400.1	ATGSTU17,ERD9,GST30,GST30B	Glutathione S-transferase family protein	2.0	21	CUAUGUGAGCCGUAAGACCC	UUGUGUUGAUGGCUCGCAUAG	Cleavage

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.