



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SILVANA REGINA ROCKENBACH MARIN

**RESPOSTAS MOLECULARES DE GENÓTIPOS DE SOJA
EM CONDIÇÃO DE HIPÓXIA**

Londrina
2019



Universidade Estadual de Londrina



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

SILVANA REGINA ROCKENBACH MARIN

**“Respostas moleculares de genótipos de soja
em condição de hipóxia”**

**Londrina
2019**

SILVANA REGINA ROCKENBACH MARIN

**RESPOSTAS MOLECULARES DE GENÓTIPOS DE SOJA EM
CONDIÇÃO DE HIPÓXIA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Dr. Alexandre Lima Nepomuceno

Co-orientadora: Dra. Renata Fuganti-Pagliarini

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Marin, Silvana Regina Rockenbach.

Respostas moleculares de genótipos de soja em condição de hipóxia / Silvana Regina Rockenbach Marin. - Londrina, 2019.
160 f. : il.

Orientador: Alexandre Lima Nepomuceno.

Coorientador: Renata Fuganti-Pagliarini.

Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Soja - Genética Molecular - Tese. 2. Soja - Tolerância encharcamento - Tese. 3. Soja - Expressão de miRNAs sob condição de hipóxia - Tese. I. Lima Nepomuceno, Alexandre . II. Fuganti-Pagliarini, Renata . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

SILVANA REGINA ROCKENBACH MARIN

**RESPOSTAS MOLECULARES DE GENÓTIPOS DE SOJA
EM CONDIÇÃO DE HIPÓXIA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

PRESIDENTE

Dr. ALEXANDRE LIMA NEPOMUCENO

TITULARES

Dr. FABRICIO MARTINS LOPES

Dra. LARISSA ALEXANDRA CARDOSO MORAES

Dra. LILIANE MARCIA MERTZ HENNING

Dra. LÍGIA ERPEN DALLA CORTE

Londrina, 27 de Fevereiro de 2019.

EMBRAPA

UTFPR

EMBRAPA

EMBRAPA

EMBRAPA

(Handwritten signatures and names of the examiners)
Fabricio M. Lopes
Larissa A.C. Moraes
Liliane M. Mertz Henning
Ligia Erpen Dalla Corte

*Aos amados de minha vida: Maurício, Daniel, Lucas e Matheus...
Por tornarem os meus dias mais felizes.*

*À minha mãe Cristina (in memoriam).
Minha inspiração e exemplo de vida.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo a Deus, autor e consumidor de tudo; por ter me criado e capacitado, e em sua soberania preenchido minha vida com pessoas e oportunidades maravilhosas... *Soli Deo Glória!*

À minha família amada pelo constante incentivo, paciência e carinho.

À minha irmã Sandra, sempre alegre e disposta a ajudar.

Ao meu orientador Dr. Alexandre Nepomuceno, pelo exemplo de profissionalismo e competência, pela amizade, orientação, ensinamentos, compreensão e incentivo em todos os momentos.

À co-orientadora e amiga Dra. Renata Fuganti Pagliarini por toda ajuda, paciência, conversas, conselhos, risadas e momentos de crescimento pessoal e profissional.

À Dra. Liliane Henning pela confiança, amizade e preciosa colaboração para desenvolvimento desse trabalho.

À Embrapa-Soja, local em que amo trabalhar, pela infra-estrutura laboratorial, suporte imprescindível para a realização deste trabalho.

À Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade de aprendizado, e convivência com competentes docentes.

À Profa. Dra. Silvia Helena Sofia coordenadora comprometida com o Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela amizade, atenção, e carinho que sempre demonstrou.

Aos pesquisadores da Embrapa Soja Dr. Ricardo Abdelnoor, Dra. Francimar Marcelino, Dr. Alvaro Almeida pela convivência tão agradável e valiosos ensinamentos;

Ao Claudinei e equipe do laboratório Ecofisiologia da Embrapa Soja por toda ajuda e amizade.

Aos amigos; César, André, Lizandra, Mayla, Daniel pela inestimável amizade, carinho e disposição em ouvir e em ajudar sempre.

A todos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal: Verinha, Vieira, Márcia, Aninha, Danielle, Adriana, Kênia, Suellen, Rafael, Maria Helena, João, Maria Heloisa, Geovana, Ligia, Valerinha, Abe, Roberta, Fernanda, Alice, Alessandra, David, Luciane, Bruna, Caroline e todos os demais que passaram pelo Lab. São os bons momentos de convívio, aprendizado e amizade que fazem diferença na vida...

Aos doutores Fabrício Martins Lopes, Larissa Alexandra Cardoso, Ligia Erpen Dalla Corte, Liliane Marcia Mertz-Henning por aceitarem avaliar esta tese com sugestões construtivas, enriquecendo este trabalho.

E todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização e desenvolvimento deste trabalho, o meu sincero agradecimento e reconhecimento.

Minha Gratidão a todos!

*“Todas as coisas foram feitas por Ele,
e sem Ele nada do que foi feito se fez”.*
João 1:3

MARIN, Silvana Regina Rockenbach. **Respostas moleculares de genótipos de soja em condição de hipóxia**. 2019. 160 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

A soja figura entre as quatro culturas de maior importância para a agricultura e economia mundial, devido a composição do grão que permite uma ampla aplicabilidade em diversos setores da indústria. Mas o sucesso da produção depende de condições ideais de cultivo, que podem ser severamente prejudicadas por uma série de fatores abióticos, entre eles se destaca as condições de alagamento do solo que podem ocorrer em decorrência de modificações climáticas que alteram o regime de chuvas ou por características específicas dos solos hidromórficos. A condição de alagamento ou encharcamento do solo provoca a deficiência de oxigênio levando a hipóxia ou anóxia, que promove alterações na composição e estrutura do solo e comprometem a absorção de água e nutrientes pela planta e assim, o desenvolvimento e produção. Para se adaptar à esta condição, as plantas desenvolvem respostas complexas que envolvem a regulação da expressão gênica tanto no nível transcricional como pós transcricional. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar as respostas fisiológicas, agronômicas e moleculares de genes relacionados à condição de hipóxia em genótipos de soja tolerantes e sensíveis à condição de encharcamento, e também analisar o perfil de expressão de miRNAs e seus potenciais genes alvos. Foram conduzidos dois experimentos em casa de vegetação um em vaso contendo substrato e simulando a condição de encharcamento para determinar a expressão de genes envolvidos nas respostas a essa condição e outro em sistema hidropônico para identificar os miRNAs expressos em resposta a hipóxia. Como resultado, constatamos que a hipóxia gerada pelo encharcamento teve consequências não apenas para o metabolismo do carbono, mas também para o metabolismo do nitrogênio. Em síntese os genótipos responderam ao encharcamento inicialmente com estratégias de adaptações anatômicas e morfológicas como a formação de raízes adventícias. Os genótipos tolerantes apresentaram um mecanismo envolvendo prioritariamente a mudança de expressão de genes relacionados ao ajuste metabólico regulando a alteração da respiração aeróbica para anaeróbica. Em relação ao possível mecanismo de controle pós transcricional mediado por miRNAs em resposta a condição de hipóxia, sugerimos que os miRNAs potencialmente regulam a expressão de genes de fatores de transcrição, genes de sinalização e genes de ajuste do metabolismo primário envolvidos na indução da fermentação, glicólise e degradação do amido, de modo tratamento e genótipo dependentes. Nosso estudo forneceu importantes informações sobre as respostas adaptativas de diferentes genótipos de soja à condição de alagamento e também dados inéditos da composição e do perfil de expressão de miRNAs de soja sob hipóxia em cultivares tolerante e sensível ao alagamento.

Palavras-chave: Alagamento. Inundação. Hipóxia. Soja. miRNA.

MARIN, Silvana Regina Rockenbach. **Molecular responses of soybean genotypes in hypoxia condition**. 2019. 160 p. Thesis (Doctorate in Genetics and Molecular Biology) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Soybeans are among the four crops of major importance for agriculture and world economy, a fact that results from the composition of the grain that allows wide applicability in various sectors of industry. However, the success of production depends on optimum cultivation conditions, which can be severely hampered by a number of abiotic factors, including soil-flooding conditions that may occur as a result of climate changes which modifies rainfall regime or characteristics of hydromorphic soils. The condition of flooding or waterlogging of the soil causes oxygen deficiency leading to hypoxia or anoxia. This condition promotes changes in the composition and structure of the soil that compromise the absorption of water and nutrients by the plant and thus, development and production. To adapt to this condition, plants develop complex responses that involve the regulation of gene expression at both the transcriptional and post-transcriptional levels. Thus, the objective of the present study was to analyze the physiological, agronomic and molecular responses of genes related to hypoxia responses in soybean genotypes tolerant and sensitive to the flooding condition, as well as to analyze the expression profile of miRNAs and their potential target genes. Two experiments were conducted in a greenhouse, one in pots containing soil substrate and simulating the flood condition to determine the expression of genes involved in the responses to this condition, and another in a hydroponic system to identify the miRNAs expressed in response to hypoxia. As a result, we found that hypoxia generated by soil flooding had consequences not only for carbon metabolism, but also for nitrogen metabolism. In summary, the genotypes initially responded to flooding with strategies of anatomical and morphological adaptations such as the formation of adventitious roots. The tolerant genotypes presented a mechanism involving, mainly, the expression change of genes related to metabolic adjustment regulating the switch from aerobic to anaerobic respiration. Regarding the possible mechanism of post-transcriptional control mediated by miRNAs in response to hypoxia condition, we suggest that miRNAs potentially regulate the expression of genes such as transcription factors, signaling genes and genes of primary metabolism adjustment involved in the induction of fermentation, glycolysis and degradation of the starch, so treatment and genotype dependent. Our study provided important information on the adaptive responses of different soybean genotypes to the flood condition and unpublished data on the composition and expression profile of soybean miRNAs under hypoxia in tolerant and flood sensitive cultivars.

Key words: Flooding. Waterlogging. Hypoxia. Soy. miRNA.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 Considerações Gerais

- Figura 1.** Evolução da área cultivada de soja em rotação com arroz. Fonte IRGA 20188
- Figura 2.** Respostas das plantas ao alagamento. A estratégia de quiescência está associada a plantas que sofrem prolongada submersão completa. A estratégia de escape é desencadeada por submersão parcial, e geralmente caracterizada pelo estiolamento da parte aérea, aumentando as trocas gasosas entre tecidos aéreos e submersos. Em nível celular, ocorre a redução da espessura da folha e o reposicionamento dos cloroplastos para maximizar a absorção de energia luminosa e a fotossíntese subaquática Adaptado de Voesenek e Bailey-Serres, 2015.....13
- Figura 3.** Organização genômica dos miRNAs. De acordo com a posição no genoma os miRNAs podem ser classificados como intergênicos, intrônicos e exônicos. Setas indicam região promotora20
- Figura 4.** Biogênese de miRNA em plantas. O miRNA primário (pri-miRNA) é transcrito no núcleo, então é processado por um conjunto de enzimas associado a DCL (*Dicer-Like1*) formando o pré-miRNA que por sua vez é processado por outro complexo enzimático, formando o miRNA maduro que é exportado para o citoplasma pela proteína HST. No citoplasma, o miRNA maduro se associa a um complexo de enzimas chamado RISC (*RNA-induced silencing complex*) e reprime ou inibe a síntese de proteínas pela clivagem (quebra) de RNAs mensageiros (mRNA) ou pode impedir a leitura do mRNA (impedir a tradução) inibindo a produção de proteínas. Adaptado de Strubberg, e Madison, 2017.....23

CAPÍTULO 2 Caracterização fisiológica e molecular de genótipos de soja sob alagamento

- Figura 1** Correlação entre os parâmetros fisiológicos Taxa fotossintética (A), Condutância estomática (gs), Concentração intracelular de CO₂, (Ci), Transpiração (Tr), Temperatura Foliar (Tof) e Teor de clorofila (Clor) avaliados em genótipos de soja submetidos a condição de encharcamento. A) curto período de encharcamento, 3 dias (SF) e B) longo período de encharcamento, 11 dias (LF). Quadros vermelho indicam correlação negativa e quadros cinza indicam correlação positiva. O grau de saturação da cor dos quadros indica a força da correlação entre os parâmetros46
- Figura 2** Parâmetros fisiológicos A) Taxa fotossintética, B) Condutância estomática, C) Concentração intracelular de CO₂, D) Transpiração, E) Temperatura Foliar e F) Teor de clorofila avaliados em genótipos de soja na condição controle e submetidos a condição de curto período de encharcamento, 3 dias (SF) e longo período de encharcamento, 11 dias (LF) 47
- Figura 3** Desenvolvimento radicular das cultivares de soja BRS Macota e BR 14, consideradas, respectivamente tolerante e sensível ao encharcamento nas condições controle e encharcamento. Em A) raízes de plantas submetidas ao um curto período de encharcamento, 3 dias (SF) e em B) raízes de plantas submetidas ao um longo período de encharcamento, 11 dias (LF)48
- Figura 4** Expressão relativa, em raízes e folhas de genótipos de soja submetidos a dois períodos de encharcamento: curto, 3 dias (SF) e longo, 11 dias (LF). A) Álcool desidrogenase 1 e Álcool desidrogenase 4 (Glyma.04G240800 / Glyma.06G122600); B) Sacarose Sintase 4 (Glyma.13G114000); C) Nitrato redutase 1 (Glyma.06G109200); D) Hemoglobina não-simbionte 1 (Glyma.11G121800); E) Oxidase alternativa 1A (Glyma.04G123800) e F) Ascorbato peroxidase 1 (Glyma.12G073100).....53

Figura 5	Expressão relativa, em raízes e folhas de genótipos de soja submetidos a dois períodos de encharcamento curto período de encharcamento, 3 dias (SF) e longo período de encharcamento, 11 dias (LF). A) Prolina-4-hidroxilase 1 (Glyma.10G297300); B) Trealose-6-fosfato sintase 11 (Glyma.17G067800); C) quinase GmSRK2 (Glyma.02G135500); D) glutamate synthetase (GOGAT) (Glyma.01G026700).....	54
Figura 6	Expressão relativa, em raízes e folhas de genótipos de soja submetidos a dois períodos de encharcamento curto período de encharcamento, 3 dias (SF) e longo período de encharcamento, 11 dias (LF). A) Alanina aminotransferase GmAlaAT1 (Glyma.01G026700); B) Alanina aminotransferase GmAlaAT2 (Glyma. 07G045900); C) SAG - Clorophyll a/b binding protein - Cab21 (Glyma.16G165800) e D) GAMMAVPE gamma vacuolar processing enzyme (Glyma.04G049900)	56
Figura 7	Tendências do perfil de expressão relativa, em raízes e folhas de genótipos de soja submetidos a dois períodos de encharcamento curto período de encharcamento, 3 dias (SF) e longo período de encharcamento, 11 dias (LF) de genes envolvidos nos mecanismos de fermentação, catabolismo de sacarose, ciclo Hb/NO, prevenção e detoxicação de ROS e mecanismos de sinalização relacionados com as respostas das plantas à condição de encharcamento	57

CAPÍTULO 3 Expression profile of miRNAs in soybean roots under hypoxia

Figure 1	Normalized expression of ADH gene (Glyma.04G240800), encoding alcohol dehydrogenase (EC1.1.1.1) enzyme in soybean cultivars BR 4 and Embrapa 45, respectively, considered sensitive and tolerant to hypoxia, in normoxia (control) and in the three treatment sampling times (30 m, 4h and 28h) under hypoxia conditions67
Figure 2	Characterization of miRNAs. A) Distribution of sequence lengths of the small RNAs found in the libraries of soybean roots from cultivars BR 4 and Embrapa 45 under conditions of normoxia (BR4-C and E45-C) and hypoxia (BR4-H and E45-H) and in, B) Distribution of the miRNA in both strands of the chromosomes.....70
Figure 3	Venn Diagrams. In A) Combined comparison between the gma-miRNAs expressed in soybean cultivars BR 4 and Embrapa 45 in normoxia (control) and hypoxia conditions. Evaluation of genotype effect and oxygen availability in the expression of gma-miRNAs. In B) Comparison between normoxia and hypoxia conditions in sensitive cultivar BR 4. In C) Comparison between normoxia and hypoxia conditions in tolerant cultivar Embrapa 45. In D) Comparison between Embrapa 45 and BR 4 cultivars in normoxia (control) condition and in E) Comparison between cultivars Embrapa 45 and BR 4 in hypoxia condition73
Figure 4	Functional categorization of miRNA targets. In A) Identification of the most enriched genetic ontology (GO) terms in the molecular function category of predicted target genes for gma-miRNAs from G1group. In B) Identification of the most enriched GO terms in the biological processes category of the predicted targets genes for gma-miRNA from G2group82

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 Caracterização fisiológica e molecular de genótipos de soja sob alagamento

Tabela 1	Relação dos genótipos de soja e caracterização em relação a resposta a condição de encharcamento.....	42
Tabela 2	Identificação dos genes-alvo escolhidos relacionados as respostas vegetais a condição de hipóxia, sequências dos primers F e R, Glyma correspondente, eficiência de amplificação e descrição da função biológica.....	44
Tabela 3	Resultados dos parâmetros agronômicos avaliados nos genótipos de soja na condição controle e submetidos a 11 dias de encharcamento.....	49

CAPÍTULO 3 Expression profile of miRNAs in soybean roots under hypoxia

Table 1	Composition of miRNA libraries from soybean roots of BR 4 and Embrapa 45 cultivars, considered, respectively, sensitive and tolerant to normoxia and hypoxia conditions.....	68
Table 2	Expression profile of gma-miRNAs that showed counts in soybean cultivars BR 4 and Embrapa 45 under conditions of normoxia and hypoxia (G1 group). The arrows ↓ and ↑ indicate, respectively, repression and induction of miRNA expression.....	77
Table 3	Expression profile of gma-miRNAs that showed counts in soybean cultivars BR 4 and Embrapa 45 under conditions of normoxia and hypoxia (G2 group). The arrows ↓ and ↑ indicate, respectively, repression and induction of miRNA expression.....	80

SUMÁRIO

1.	CAPÍTULO 1: Considerações Gerais.....	1
1.1.	Introdução.....	1
1.2.	Objetivos.....	3
1.2.1	Objetivo Geral	3
1.2.2	Objetivos Específicos.....	3
1.3.	Revisão Bibliográfica	4
1.3.1	A Soja – Panorama geral	4
1.3.2	Solos alagados	6
1.3.3	Respostas fisiológicas e bioquímicas das plantas ao alagamento	9
1.3.4	Mecanismos moleculares de resposta ao alagamento	13
1.3.5	Controle pós-transcricional da expressão gênica	15
1.3.6	Origem e evolução dos miRNAs em plantas	17
1.3.7	Organização genômica de miRNAs em plantas.....	19
1.3.8	Estrutura do gene de miRNAs	21
1.3.9	Biogênese dos miRNAs de plantas	22
1.3.10	Mecanismos de ação de miRNAs	25
1.3.11	Nomenclatura dos miRNAs de plantas.....	26
1.3.12.	Ferramentas de bioinformática para análises de miRNAs.....	28
1.4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
2.	CAPÍTULO 2: Caracterização fisiológica e molecular de genótipos de soja sob alagamento.....	38
2.1.	Resumo	38
2.2.	Introdução.....	39
2.3.	Material e Métodos.....	41
2.3.1.	Obtenção do material biológico.....	41
2.3.2.	Extração de RNA e síntese de cDNA	43
2.3.3.	Expressão gênica via RTqPCR	43
2.3.4.	Medidas de Parâmetros fisiológicos.....	45
2.3.5.	Análise de parâmetros agronômicos.....	45
2.4.	Resultados e Discussão	46
2.4.1.	Parâmetros Fisiológicos	46

2.4.2.	Parâmetros Agronômicos	49
2.4.3.	Respostas Moleculares	50
2.5.	Conclusões.....	58
2.6.	Referências.....	59
3.	CAPÍTULO 3: Expression profile of miRNAs in soybean roots under hypoxia	63
3.1.	Abstract.....	63
3.2.	Introduction	64
3.3.	Results and Discussion	66
3.3.1.	Induction of hypoxia condition	66
3.3.2.	Overview of miRNA libraries.....	68
3.3.4.	Profile of mature miRNAs in soybean roots under hypoxia and normoxia.....	71
3.3.5.	Prediction of target genes of mature miRNAs identified in soybean under hypoxia	80
3.3.6.	Functional categorization of miRNA target genes	82
3.4.	Conclusions	84
3.5.	Experimental Procedures	85
3.5.1.	Biological material.....	85
3.5.2.	Validation of hypoxia conditions using RTqPCR	86
3.5.3.	RNA libraries construction and sequencing	86
3.5.4.	Data Analysis Pipeline.....	87
3.5.5.	Identification of miRNAs target genes	87
3.5.6.	miRNAs differential expression	88
3.5.7.	Enrichment analysis of miRNA target genes	88
3.6.	References	89
3.7.	Material Complementar	97
3.7.1	Table Supplementary – S1.....	97
3.7.2	Table Supplementary – S2.....	104

1.1. Introdução

Aumentar a produção de alimentos de maneira sustentável, considerando a projeção futura de aumento populacional e de mudanças climáticas, é um grande desafio para as próximas décadas (Cheeseman, J., 2016). Segundo previsões, a agricultura em todo o mundo sofrerá com a ocorrência de secas em algumas regiões e chuvas torrenciais em outras (IPCC, 2012). Culturas como trigo, soja, milho e arroz que respondem por 75% das calorias consumidas pela humanidade, direta ou indiretamente por intermédio de animais que são alimentados com esses grãos (Schlenker, W., 2018), poderão ter sua produção muito prejudicada diante das instabilidades climáticas. Dentre essas culturas, a soja se destaca como principal fonte de proteína, sendo o grão mais cultivado no Brasil. Estima-se que a partir da safra 2018/2019 o Brasil supere os Estados Unidos tornando-se o maior produtor mundial, e respondendo por 33% da produção global (CONAB, 2018).

Diversos fatores bióticos e abióticos podem interferir diretamente na produtividade, provocando prejuízos significativos para os produtores e para a economia de países essencialmente agrícolas. Entre os fatores abióticos, as condições temporárias ou permanentes de alagamento ou encharcamento do solo são problemas globais que, embora em diversas regiões, sejam eventos raros, em outras podem ser um problema crônico, constantemente enfrentado pelos produtores, resultando em sérios prejuízos (Hirabayashi et al., 2013). Um estudo analisou o impacto de 78 desastres naturais na agricultura em 48 países e concluiu que a seca afeta drasticamente a pecuária, mas quando se trata de terras cultivadas, os efeitos das tempestades e das inundações são mais devastadores para a cadeia alimentar (FAO, 2015).

Muitas áreas estão sujeitas a condições de encharcamento pelas características do solo que impedem a drenagem. Somente no Rio Grande do Sul essas áreas representam 5,4 milhões de ha, onde predomina o cultivo de espécies adaptadas a essa condição, como o arroz. No entanto, o cultivo extensivo da mesma cultura, aumenta a incidência de doenças, pragas e plantas daninhas. Nessa situação, a rotação e/ou sucessão de culturas, com substituição esporádica por culturas de sequeiro como a soja tem sido empregada como uma opção de manejo sustentável e com potencial para minimizar esses problemas (SOSBAI, 2018). Entretanto a produtividade média das lavouras de soja em áreas de várzea é de 2448 kg ha⁻¹ (IRGA, 2018) que é um resultado aquém do que se pode alcançar. Dessa forma, a identificação de mecanismos e

estratégias que resultam em ganho de funções como a melhor adaptabilidade a ambientes e condições específicas, em espécies de importância agrônômica, como a soja, representa um componente importante no esforço global para se adaptar os sistemas de cultivo aos diversos cenários agrícolas atual e futuro visando aumentar a eficiência do sistema produtivo.

De modo geral, as respostas adaptativas das plantas aos estresses abióticos consistem em um processo bastante complexo baseado principalmente, na modulação da atividade transcricional de genes estresse relacionados, que são ativados ou reprimidos e atuam tentando controlar/minimizar o dano causado pela condição ambiental adversa. Esta complexidade da expressão gênica está especialmente relacionada a um grande número de mecanismos e processos vinculados à regulação, dentre os quais se destaca os microRNAs (miRNAs) que são pequenos RNAs não-codantes, conservados ao longo da evolução, e que regulam a expressão gênica em nível pós-transcricional através da degradação ou repressão da tradução de moléculas-alvo de RNA mensageiro (mRNA) (Bartel, 2004; 2009), e atuam em uma série de processos biológicos como crescimento, desenvolvimento e adaptação a diversos estresses, sejam eles bióticos ou abióticos (Sharma *et al.*, 2017).

Em plantas, vários genes envolvidos nas respostas à condição de alagamento foram identificados, assim como um número significativo de miRNAs, no entanto, uma melhor compreensão de seu funcionamento e especificidade faz-se necessária. Esse entendimento tem ampla aplicabilidade para o controle da expressão de determinados genes que podem favorecer características relacionadas à adaptabilidade a estresses abióticos e produtividade agrônômica.

Diante do exposto e, dentro do contexto científico atual que busca por novas alternativas para o melhoramento de plantas, visando características específicas como a tolerância a estresse de encharcamento para amenizar os impactos das futuras alterações climáticas sobre a agricultura, e apresentar opções para sistemas de cultivo em solos hidromórficos, os objetivos deste trabalho foram analisar as respostas moleculares de genes relacionados com a condição de hipóxia em soja, incluindo o perfil de expressão de miRNAs e seus potenciais genes alvos. A identificação e a compreensão das respostas moleculares da soja a condição de hipóxia e os mecanismos de controle pós transcricional, podem fornecer informações importantes na tomada de decisão no desenvolvimento de estratégias de melhoramento de plantas via ferramentas da engenharia genética de precisão, visando a obtenção de cultivares mais tolerantes.

1.2. Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Caracterizar respostas moleculares, fisiológicas e agronômicas de genótipos de soja sob diferentes períodos de alagamento, e avaliar *in silico* as relações regulatórias entre miRNAs e seus potenciais alvos em soja sob condição de hipóxia.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Identificar o perfil de expressão de genes importantes nas respostas ao alagamento em folhas e raízes de genótipos de soja contrastantes em dois períodos de alagamento;
- Caracterizar as respostas fisiológicas de genótipos de soja contrastantes em dois períodos de alagamento;
- Caracterizar parâmetros de rendimento em genótipos de soja contrastantes sob condição de alagamento;
- Identificar os miRNAs diferencialmente expressos envolvidos nas respostas ao alagamento em soja;
- Identificar os potenciais genes alvos dos miRNAs, relacionados aos mecanismos moleculares de resposta ao alagamento e;
- Correlacionar a expressão de genes importantes nas respostas ao alagamento com os mecanismos de tolerância em diferentes genótipos de soja.

1.3. Revisão Bibliográfica

1.3.1 A Soja – Panorama geral

A soja (*Glycine max (L.) Merrill*) é uma leguminosa muito versátil. O grão é componente essencial na fabricação de rações animais e um elemento importante na dieta de grande parte da população mundial, além de sua ampla utilização na formulação de vários produtos na indústria química e também para a produção de bicomcombustível e nutracêuticos. Sua extensa utilização deve-se a composição do grão, que é fonte de óleo e proteína vegetal com alto valor nutritivo; além de, macronutrientes, minerais e outros metabólitos secundários como isoflavonas e fitoestrógenos benéficos para a saúde (Johnson *et al.*, 2015).

Originária da Ásia Oriental, a soja foi introduzida no Brasil em 1882; contudo, devido às condições edafoclimáticas somente a partir do final da década de 1940 tornou-se cultivada com objetivos comerciais. Os avanços científicos e a disponibilização de tecnologias ao setor produtivo permitiram sua adaptação às diferentes regiões edafoclimáticas, além de minimizar os efeitos dos diferentes estresses bióticos e abióticos que interferem na produtividade da cultura, possibilitando o incremento da produtividade média por hectare, atingindo os maiores índices mundiais e colocando a soja em lugar de destaque na economia brasileira e mundial (Gazzoni; Dall' Agnol, 2018).

Hoje, nosso país é responsável por 33% da produção mundial do grão, que além de abastecer o mercado interno representa o principal produto agrícola na pauta de exportações brasileiras. A soja é ainda a maior responsável pelo aumento da colheita nacional de grãos, posicionando o Brasil como maior exportador e segundo maior produtor do grão (CONAB 2018), com previsão de alcançar e se consolidar na primeira posição à partir da safra 2018/2019 (USDA, 2018). A projeção da produção para a safra de 2026/27 é de 146,5 milhões de toneladas, que representa um acréscimo de 29,7% em relação à produção de 2016/17, com aumento de 27,5% na área plantada (MAPA, 2017).

Os patamares altos e a baixa oscilação de preços da soja tem motivado a expansão das fronteiras agrícolas da cultura, tanto para áreas com condições edafoclimáticas favoráveis, quanto para áreas de várzeas em sistema de rotação com arroz, como uma opção de manejo com potencial para minimizar os problemas com pragas e doenças decorrentes do cultivo extensivo da mesma cultura (SOSBAI, 2014).

Porém, mesmo com o aumento expressivo da produção de alimentos no último meio século, um dos maiores desafios para as próximas décadas será a segurança alimentar. Fatores como o aumento na demanda por alimentos, fibras e combustíveis devido ao crescimento demográfico previsto para nove bilhões de pessoas até 2050, associado aos efeitos adversos para a agricultura decorrentes das mudanças climáticas globais, que imporá restrições em áreas aptas para o cultivo, e a maior severidade nos estresses abióticos e bióticos interferindo diretamente na produção (Keating *et al.*, 2014; Cheeseman, J., 2016) colocam em risco o acesso regular e permanente a alimentos de qualidade, em quantidade suficiente.

A produtividade e a distribuição espacial de importantes culturas como a soja, podem ser severamente limitadas pelas restrições ambientais, impostas por fatores abióticos e bióticos aos quais as plantas estão constantemente expostas. Portanto, novas alternativas/soluções para minimizar/mitigar os problemas ocasionados por alterações climáticas e que ainda mantenham ou aumentem a produção de alimentos de maneira sustentável devem ser perseguidas. Neste contexto, os avanços científicos na área de biotecnologia vêm ampliando as oportunidades na agricultura. Técnicas de melhoramento molecular e engenharia genética de precisão permitem atualmente, a manipulação de genes de interesse possibilitando o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas com características mais adaptadas às diferentes condições edafoclimáticas (Ainsworth *et al.*, 2012). Ainda nesse panorama, o sequenciamento do genoma da soja (Schmutz *et al.*, 2010) ampliou as informações sobre essa espécie vegetal, tornando-se uma ferramenta importante para estudos que visam à compreensão da complexa rede de interações gênicas.

O genoma da soja está organizado em 20 cromossomos, de acordo com os 20 grupos de ligação, com a presença de sequências altamente repetitivas, heterocromáticas com baixa recombinação (57% do genoma), e sequências em regiões eucromáticas, pouco repetitivas e com alta taxa de recombinação (43% do genoma). A primeira versão do genoma da soja consistiu de 950 megabases (Mb), com 46.430 genes preditos como codificadores de proteína, sendo que 12,2% foram identificados como fatores de transcrição (Schmutz *et al.*, 2010). A segunda montagem do genoma de referência da soja lançada em 2013 corrigiu várias questões na reconstrução de pseudomoléculas. A sequência do genoma e os modelos de genes foram substancialmente melhorados na versão mais recente; o tamanho previsto do genoma da soja é de 1,1 Gb, o tamanho

montado é de 978Mb e 56.044 genes foram preditos como codificadores de proteínas (<https://www.soybase.org/genomeannotation/>).

1.3.2 Solos alagados

As plantas podem ser submetidas a diferentes cenários ambientais, dentre eles níveis crescentes de excesso de água, que vão desde o alagamento até a submersão completa. O termo alagamento é mais amplo, e frequentemente usado para descrever diferentes situações em que há uma camada de água acima da superfície do solo que pode ser superficial ou profunda, provocando uma submersão parcial ou completa da planta. Enquanto o termo encharcamento corresponde à saturação total dos poros do solo com água podendo apresentar uma camada muito fina de água acima da superfície do solo. Assim, em condições de encharcamento, apenas o sistema radicular da planta está sob as condições anaeróbicas impostas pela falta de oxigênio, enquanto a parte aérea está em condições atmosféricas normais (Striker, 2012).

A duração do alagamento é um fator importante na determinação da sobrevivência da planta, e está relacionada com a disponibilidade de oxigênio (O_2). Tanto em condições naturais como em experimentais, as plantas podem ser submetidas a níveis de O_2 que variam desde os teores normais (normóxia), passando pela deficiência (hipóxia) ou até mesmo pela ausência (anoxia). A hipóxia é a forma mais comum de estresse em solos sob excesso de água. Em geral, ocorre em períodos de curta duração de encharcamento ou alagamento, quando as raízes estão submersas, mas a parte aérea permanece em contato com o ar. No entanto, pode ocorrer também em raízes próximas à superfície da água, em casos de encharcamento ou alagamento de longa duração (Sairam *et al.*, 2008). A anoxia ocorre nos solos submetidos a longos períodos de submersão, em plantas completamente submersas em água e em raízes muito abaixo da superfície da água em solos alagados (Striker, 2012).

De modo geral, em solos alagados ocorrem uma série de alterações físicas, químicas e biológicas que alteram a capacidade de suportar o crescimento das plantas. Dentre estas modificações ocorre a substituição do ar pela água nos poros do solo, os agregados são destruídos e a lâmina de água restringe as trocas gasosas com a atmosfera, há a formação de duas camadas uma superficial oxidada e outra mais profunda reduzida com predominância de microorganismos anaeróbicos, e a ausência de nitrificação devido ao nitrogênio inorgânico estar na forma amônio (NH_4^+). Os

microorganismos anaeróbicos utilizam o O_2 presente na matéria orgânica como receptores de elétrons para realizar o processo de fermentação, produzindo metano e amônia. Outro efeito importante do alagamento é o aumento do pH e da disponibilidade de alguns nutrientes no solo. Mudanças no pH e no potencial redox do solo alteram o equilíbrio de cátions e prótons, promovendo fitotoxicidade de metais, redução de mineralização, redução de cálcio e de matéria seca, alterando a disponibilidade de nutrientes (Souza *et al.*, 2015).

A condição de alagamento ou encharcamento do solo pode ocorrer devido ao aumento do volume de chuvas ocasionado por alterações climáticas, ou também devido às características específicas dos solos, como em áreas de várzea que apresentam drenagem natural deficiente (hidromorfismo). Nestas áreas, as características morfológicas, físicas, químicas e mineralógicas variam de acordo como o grau de hidromorfismo e heterogeneidade do material de origem do solo (Marchezan, 2016).

No Brasil, o estado do Rio Grande do Sul possui uma área de solos hidromórficos de 5,4 milhões de ha também denominados “terras baixas”. Desse total, aproximadamente 3 milhões de ha são aptos para o cultivo, sendo que cerca de 1,1 milhão de ha são cultivados extensivamente com arroz irrigado e o restante permanece em pousio ou é utilizado para pecuária de corte (CONAB, 2018). Este estado é o maior produtor nacional de arroz respondendo por 70% da produção (SOSBAI, 2016), e o terceiro produtor nacional de soja, que é cultivada principalmente na região norte do estado onde as características dos solos são favoráveis para essa cultura (CONAB, 2018).

Nos últimos anos tem ocorrido a expansão do cultivo de soja para as áreas de terras baixas em rotação ao arroz irrigado (Figura 1), como uma alternativa de manejo para minimizar os problemas com pragas e doenças decorrentes do cultivo extensivo da mesma cultura, especialmente o controle de arroz vermelho, e também como forma de melhoria da sustentabilidade financeira das propriedades, devido aos bons preços alcançados pela cultura da soja no mercado internacional (Marchezan, 2016).

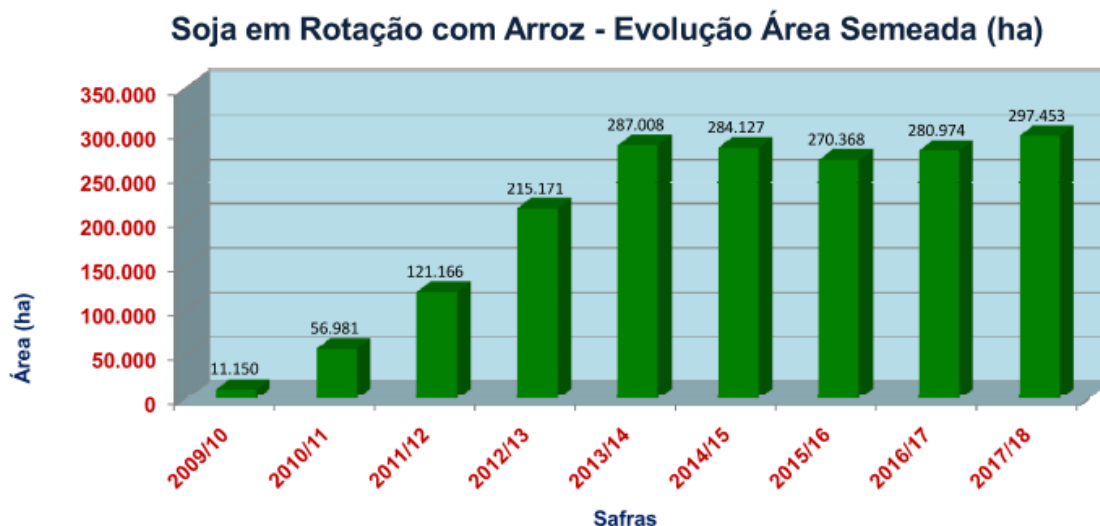


Figura 1. Evolução da área cultivada de soja em rotação com arroz. Fonte IRGA 2018.

Do ponto de vista técnico o uso de leguminosa em sistema de rotação e sucessão com gramínea é uma excelente alternativa, porque interfere no ciclo de doenças e pragas e permite a utilização de herbicidas não seletivos para controle de plantas daninhas, reduzindo o uso de defensivos agrícolas e assim, os custos e riscos de contaminação dos alimentos e do ambiente; também proporciona a fixação biológica de nitrogênio e a melhoria na ciclagem de nutrientes (SOSBAI, 2016).

Produtores do extremo sul do RS relataram um ganho de 30% acima da média da região depois da adoção da rotação arroz-soja (Agrimec, 2018). O aumento de produtividade das lavouras de arroz, o melhor controle de plantas daninhas, aliado a um cenário favorável para comercialização da soja no mercado internacional são fatores decisivos para a expansão da cultura da soja em áreas de arroz irrigado.

O sucesso do cultivo de espécies de sequeiro em áreas alagadas requer manejos culturais e de solo a fim de reduzir as limitações provocadas pelo encharcamento, além do uso de cultivares mais adaptadas para se desenvolverem e produzirem em condição de deficiência de oxigênio (Pinto *et al.*, 2006). Atualmente, a produtividade média das lavouras de soja em áreas de várzea é de 2448 kg ha⁻¹ (IRGA, 2018), e ainda representa um resultado aquém do que se pode alcançar, considerando que a produtividade nacional da soja é de 3.333 kg ha⁻¹ (EMBRAPA, 2018).

1.3.3 Respostas fisiológicas e bioquímicas das plantas ao alagamento

A maioria das plantas é sensível a condições de excesso de água, onde a drástica redução da disponibilidade de oxigênio restringe a respiração e afeta a sobrevivência e o desenvolvimento vegetal. No entanto, um amplo espectro de respostas adaptativas para deficiência de oxigênio foi desenvolvido pelas plantas, que eventualmente resulta na tolerância. Muitas destas adaptações anatômicas, morfológicas e fisiológicas foram descritas em algumas espécies e um progresso considerável foi feito para a compreensão dos aspectos moleculares envolvidos na tolerância ao encharcamento (Pucciariello et al, 2014; Loreti et al., 2016).

As teorias propostas para explicar a tolerância das plantas ao alagamento estão relacionadas ao processo de respiração. Em condições de alagamento, as plantas inicialmente realizam a respiração por meio da fermentação láctica, entretanto isso provoca rápida acidificação do citoplasma, promovendo a morte dos tecidos radiculares. Isso ocorre devido ao colapso entre o vacúolo e o citoplasma que com o tempo perde prótons (H^+) do vacúolo para o citoplasma diminuindo o pH. As plantas mais tolerantes são aquelas que conseguem passar mais rapidamente da fermentação láctica para a alcoólica, não apenas detendo a acidificação mas também alcalinizando o meio. Na fermentação alcoólica as enzimas piruvato descarboxilase (PDC) e álcool desidrogenase (ADH) atuam convertendo o piruvato proveniente da glicólise a aldeído acético pela ação de PDC e finalmente a etanol pela ação de ADH (Felle, 2005).

A morte das plantas, em condições de alagamento pode ocorrer também pela desintegração dos tecidos, resultado da desorganização dos lipídios e proteínas da membrana por espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*). Infere-se que as plantas tolerantes tenham maior proteção devido ao acúmulo de antioxidantes e enzimas como a superóxido dismutase (Arru et al., 2014).

Do ponto de vista da homeostase, as plantas investem seus recursos limitados em mudanças anatômicas que arejam os tecidos internos ou elevam a produção de energia anaeróbica (Pucciariello et al, 2014; Loreti et al., 2016). De modo geral, as plantas respondem a condições de baixo teor de oxigênio em três estágios distintos: a transferência de sinal (que ocorre entre 0-4 h em condições de hipóxia), a reprogramação metabólica (4-24 h) e as transformações morfológicas decorrentes das duas primeiras etapas (24-48 h) (Sharma et al., 2017).

Em períodos curtos de alagamento, como um ou dois dias, as mudanças metabólicas produzem enzimas da via glicolítica e fermentativa, conhecidas como proteínas de estresse anaeróbico, que ajudam as plantas a tolerar a hipóxia nas raízes (Sairam *et al.*, 2008; Irfan *et al.*, 2010). Quando ocorrem períodos mais longos de alagamento, as alterações em nível metabólico resultam em alterações morfológicas no sistema radicular, como o desenvolvimento de aerênquima, raízes adventícias e hipertrofia do caule das plantas. Também podem ocorrer a morte da raiz principal e o aumento da quantidade de raízes laterais com drástica queda no volume total de raízes (Striker, 2012).

O padrão de resposta das plantas ao excesso de água no solo é determinado pela duração e intensidade do estresse, mas também pela fase de desenvolvimento da planta no momento da imposição do estresse e pelo genótipo da planta (Colmer; Voeselek, 2009). As plantas possuem um conjunto de características que permitem a aeração do tecido e/ou ajuste metabólico durante a hipóxia ou mesmo anóxia. Diferentes espécies, ou mesmo diferentes genótipos da mesma espécie, adotam uma estratégia específica de acordo com a intensidade e duração do estresse a que são submetidas. Essas estratégias são classificadas em evasão, escape e quiescência (Colmer; Voeselek, 2009; Van Veen *et al.*, 2013; Loreti *et al.*, 2016).

A estratégia de evasão permite que as plantas completem seu ciclo de vida entre dois episódios de inundação. Na estratégia de escape, ocorrem mudanças morfológicas e anatômicas, como o estiolamento da parte aérea, a formação de aerênquimas e raízes adventícias, permitindo que a planta adquira mais oxigênio do ambiente circundante e entregue aos tecidos internos (Bailey-Serres; Voeselek, 2008; Colmer; Voeselek, 2009; Loreti *et al.*, 2016). Enquanto que a estratégia de quiescência depende unicamente da produção de energia anaeróbica, nesta condição o crescimento é suprimido e não ocorrem as alterações mencionadas na estratégia de escape (Bailey-Serres e Voeselek, 2008; Colmer; Voeselek, 2009; Loreti *et al.*, 2016). A maioria das culturas emprega a estratégia de escape ou de quiescência para lidar com o estresse causado por alagamento.

Durante um estresse prolongado, a estratégia de escape é preferida, no entanto, em condições transitórias, a preferência é pela estratégia de quiescência (Colmer; Voeselek, 2009, Loreti *et al.*, 2016). As plantas que utilizam a estratégia de escape tem baixos níveis internos de O₂, devido à sua alta atividade metabólica, suprida por um

forte fluxo glicolítico e mobilização de reservas, indicando que essas plantas sofrem redução da fixação de carbono (Loreti *et al.*, 2016).

Como resultado de uma restrição de absorção de CO₂ devido ao fechamento dos estômatos, a fotossíntese é severamente reduzida, mas as plantas podem recuperar o contato aéreo através da estratégia de escape, restaurando parcialmente a fotossíntese, reduzindo a necessidade de mobilização de reserva e limitando a escassez de oxigênio via aerênquima (Loreti *et al.*, 2016).

Além da inibição estomática da fotossíntese, a inibição direta das enzimas fotosintéticas também pode ocorrer pelo ácido sulfídrico (H₂S) produzido em solos alagados, e pelo acúmulo de hormônios nas folhas. Em condições de alagamento, a translocação de citocininas de raízes para folhas sofre um declínio, enquanto a translocação de ácido abscísico (ABA) e etileno aumenta (Voesenek; Bailey-Serres, 2015, Steffens; Rasmussen, 2016).

Assim, o fechamento dos estômatos sob inundação pode ocorrer em resposta à desidratação das folhas, onde as células-guarda perdem seu turgor, mas também podem ocorrer sem mudanças perceptíveis no potencial hídrico foliar respondendo a uma regulação hormonal (não-hidráulica) mediada pela ação do ácido abscísico (ABA) nas folhas, e não sintetizado e transportado a partir das raízes, como acontece sob déficit hídrico (Striker *et al.*, 2012).

Por outro lado, as plantas que utilizam a estratégia de quiescência dependem da mobilização de reservas para sustentar as funções celulares, tanto no alagamento de curto quanto de longo período. O desenvolvimento e mudanças na arquitetura de raízes, através de mecanismo induzido pelo aprisionamento de etileno nos tecidos e morte celular induzida por espécies reativas de oxigênio (ROS), é essencial para a sobrevivência nestas condições (Loreti *et al.*, 2016). As estratégias de crescimento induzidas por etileno durante o alagamento têm diferentes efeitos a curto e longo prazos sobre o desempenho da planta e são primordiais para a sua sobrevivência (Loreti *et al.*, 2016).

Em condições anaeróbicas do solo, a redução na respiração aeróbica nas raízes é o efeito inicial, porém, a quantidade de ATP, o perfil de energia total das células da raiz e a relação ATP/ADP são também reduzidos, uma vez que, a conservação de energia na forma de ATP é muito menor na respiração anaeróbica. Outro efeito é o acúmulo de etanol em níveis tóxicos, que ocorre pois o etanol é o produto final da respiração anaeróbica. Para produzir ATP suficiente para a sobrevivência celular, a taxa de

respiração anaeróbia deve ser mantida a um nível elevado, de modo que uma quantidade excessiva de etanol é produzida no citosol e armazenada no vacúolo (Banti *et al.*, 2013; Arru *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2017).

A respiração anaeróbica é incapaz de fornecer de forma adequada ATP para a absorção de nutrientes ativos, limitando o acúmulo de nutrientes, reduzindo a transpiração e, como resultado, a taxa de entrega de nutrientes dissolvida no fluido do xilema para os brotos é reduzida. Assim plantas sensíveis ao alagamento apresentam clorose devido à absorção reduzida de nutrientes e à toxicidade do ferro (Felle, 2005).

Ainda, devido à relativa ineficiência energética da respiração anaeróbica, as raízes de plantas em condições alagadas exigem a utilização de uma grande quantidade de carboidratos, entretanto a translocação de carboidratos das folhas para raízes é dificultada na condição de alagamento, tornando os tecidos radiculares deficientes em carboidratos (Voeselek; Bailey-Serres, 2015, Steffens; Rasmussen, 2016).

A formação de aerênquima em diferentes partes da planta como raízes, rizomas, caule, pecíolos e folhas ajudam no crescimento adequado das raízes e na sua sobrevivência sob o condição reduzida de O₂. Os aerênquimas permitem a condutância de O₂ e outros gases na planta e também aumentam a capacidade de armazenamento de O₂ (Voeselek; Bailey-Serres, 2013, Steffens; Rasmussen, 2016).

Ainda, em condições de alagamento, a permeabilidade e a condutância hidráulica das raízes diminuem, resultando em murcha da planta. A expansão acelerada da célula lateral com o aumento do espaço intercelular e a lise celular induzem a hipertrofia que aumenta a porosidade na base do caule e promove a aeração para formação de raízes adventícias (Voeselek; Bailey-Serres, 2013, Steffens; Rasmussen, 2016). Assim, as raízes antigas são substituídas pelas raízes adventícias que atuam como um mecanismo de sobrevivência e desempenham um papel significativo na estratégia de escape, fornecendo oxigênio, água e minerais para a planta, e desse modo, a tolerância ao alagamento está correlacionada com a formação de raízes adventícias (Voeselek e Bailey-Serres, 2013, Steffens e Rasmussen, 2016). Estas raízes são mais permeáveis à água e, portanto, capazes de melhorar o transporte de água para parte aérea. Entretanto, o fluxo total de água nas plantas será menor porque as raízes adventícias têm uma condutância hidráulica inferior.

A biossíntese e a percepção do etileno são necessárias para a formação de raízes adventícias, e o aumento de etileno ocorre porque o tecido interno das raízes é totalmente desprovido de oxigênio (anóxico) em comparação com os tecidos corticais

periféricos com menos oxigênio (hipóxia). A disponibilidade de O_2 nas raízes afeta a atividade de ACC (ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico) oxidase e ACC sintase, que são enzimas chave na biossíntese de etileno. Enquanto, ACC oxidase requer O_2 e não é sintetizada no centro das raízes (anóxico), ACC sintase aumenta sua atividade nesta condição, e assim ACC oxidase difunde para células externas das raízes (mais hipóxico) onde pode completar a síntese de etileno. O etileno produzido induz a formação de aerênquima e, através de tais passagens de gás, o transporte de etileno da raiz para as folhas aumenta (Yamauchi *et al.*, 2016; Ben-Noah; Friedman, 2018).

Especificamente em soja, a produção endógena de etileno é aumentada em plantas submetidas a longos períodos de hipóxia, prejudicando a nodulação e diminuindo a sobrevivência de bactérias responsáveis pela nodulação, o que resulta na redução no mecanismo de fixação biológica de nitrogênio, limitando o rendimento do grão (Bailey-Serres *et al.*, 2012).

Uma visão geral dos estímulos que desencadeiam as respostas das plantas às diferentes condições de alagamento é apresentado na Figura 2.

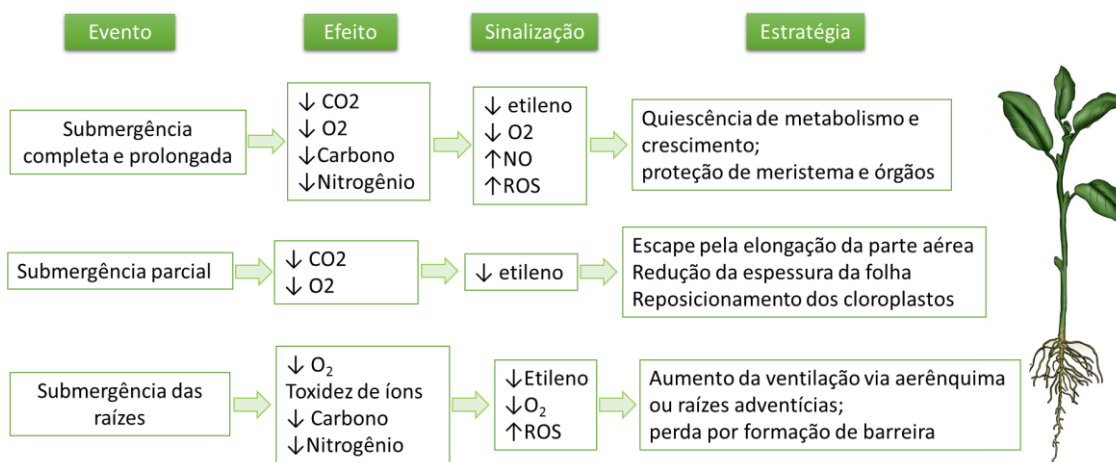


Figura 2. Respostas das plantas ao alagamento. A estratégia de quiescência está associada a plantas que sofrem prolongada submersão completa. A estratégia de escape é desencadeada por submersão parcial, e geralmente caracterizada pelo estiolamento da parte aérea, aumentando as trocas gasosas entre tecidos aéreos e submersos. Em nível celular, ocorre a redução da espessura da folha e o reposicionamento dos cloroplastos para maximizar a absorção de energia luminosa e a fotossíntese subaquática (Adaptado de Voesenek e Bailey-Serres, 2015).

1.3.4 Mecanismos moleculares de resposta ao alagamento

O estudo das respostas vegetais aos estresses abióticos, em todos os níveis do transcriptoma, ou seja, o conjunto de transcritos expressos em uma célula em um

determinado estágio de desenvolvimento ou condição fisiológica, revela a natureza complexa das respostas multigênicas em plantas; e tem demonstrado ser uma importante ferramenta no entendimento dos processos biológicos, contribuindo para a caracterização da resistência ou da tolerância das plantas a uma condição específica (Payton *et al.*, 2009; Venu *et al.*, 2013).

Nas duas últimas décadas um rápido avanço na compreensão de aspectos estruturais e funcionais de genomas de plantas ocorreu. Estes progressos foram facilitados pela adoção de plantas modelo para a maioria das famílias vegetais economicamente importantes, bem como o desenvolvimento de recursos da genômica, transcritoma e metaboloma. Os projetos de sequenciamento de grandes culturas têm melhorado ainda mais a compreensão da estrutura genômica, da evolução, e das funções biológicas dos genes (Augustine *et al.*, 2014; Das e Parida, 2013).

Os genes ativados sob o estresse do alagamento foram classificados em três categorias: genes sensíveis à detecção de oxigênio e envolvidos na sinalização celular, genes de ajuste metabólico e genes que mantêm os microambientes internos da planta (Sharma *et al.*, 2017). Os genes sensíveis ao oxigênio e sinalização celular induzem a síntese da enzima oxidase alternativa (AOX) para ativar uma rota alternativa para a passagem de elétrons na cadeia respiratória, reduzindo a geração de ATP. Também, esses genes estimulam a proteína ativadora Rop GTPase relacionada as espécies reativas de oxigênio (ROS). E ainda, alguns genes podem codificar proteínas importantes envolvidas na sinalização de Ca^{2+} , como calmodulina e CAP (peptídeo associado à calmodulina) (Sharma *et al.*, 2017).

Os genes de ajuste metabólico regulam a mudança da respiração aeróbica para a fermentação anaeróbica, aumentando a síntese das proteínas anaeróbicas (ANPs). A expressão de genes relacionados ao metabolismo aeróbico podem ser regulada negativamente enquanto àqueles genes necessários para o metabolismo anaeróbico são estimulados (Sharma *et al.*, 2017). Os genes codificadores das enzimas que atuam na rota de fermentação alcoólica como a piruvato descarboxilase (PDC), álcool desidrogenase (ADH), assim como o gene codificador da enzima lactato desidrogenase (LDH), que atua na fermentação láctica, têm suas expressões aumentadas em plantas submetidas a condição de alagamento e estão associadas à capacidade de resposta de plantas de soja ao alagamento do solo (Komatsu *et al.*, 2009).

Os genes que mantêm os microambientes internos de plantas ativam a glutamato descarboxilase (GAD), enzima que catalisa a descarboxilação do glutamato para o ácido

gama-aminobutírico (GABA) e CO₂, que interage com a calmodulina, levando à regulação do pH (Sharma *et al.*, 2017).

Entre as culturas, o arroz é bem conhecido por ser tolerante à submersão, podendo germinar mesmo na ausência completa de O₂, e ainda, as variedades de arroz que possuem os genes Sub1A ou Snorkel (SK) podem adotar estratégias de sobrevivência também na fase adulta (Bailey-Serres; Voisenek 2008). Vários ortólogos de genes SK e SUB1 foram encontrados em soja, porém, nenhum dos genes SK mostrou expressão significativa sob condições de alagamento tanto em genótipos tolerantes quanto sensíveis ao alagamento e portanto, esses genes podem ser pseudo-genes ou terem padrões de expressão específicos de tecidos ou condições. Especula-se que os genes SK perderam sua função durante a evolução da soja, uma vez que ela é cultivada em ambientes predominantemente secos (Syed *et al.*, 2015).

Em *Arabidopsis*, os ajustes transcricionais da depleção de oxigênio são desencadeados por genes de fator de resposta ao etileno (ERF) *RAP2.2* e *RAP2.12* que atuam na regulação de genes de resposta a hipóxia, tais como genes de enzimas envolvidas com ROS, genes de sinalização e biossíntese de ABA e outros genes responsivos ao encharcamento (Gasch *et al.*, 2015; Paul *et al.*, 2016).

Na adaptação das plantas ao estresse de hipóxia, os genes de hemoglobinas não-simbióticas (nsHbs) também são cruciais para vários processos celulares. As hemoglobinas não simbióticas de classe 1 (nsHb1) estão envolvidas no controle dos níveis de óxido nítrico (NO) produzido à partir do nitrato acumulado durante a privação do oxigênio. Assim, a manutenção do metabolismo redox e do estado energético celular é realizada pela nsHb1 por meio da oxidação do NO e NAD(P)H (Riquelme; Hinrichsen, 2015).

1.3.5 Controle pós-transcricional da expressão gênica

A complexa integração de respostas bioquímicas e fisiológicas das plantas às condições bióticas e abióticas, implica não apenas na regulação transcricional e traducional de genes específicos, mas também em mecanismos regulatórios pós-transcriptionais e pós-traducionais, cada um integrando os parâmetros metabólicos.

Os MicroRNAs (miRNAs) compõem uma classe de pequenos RNAs endógenos que se tornaram conhecidos nas últimas décadas como os principais reguladores de genes no nível pós-transcriptional. Os miRNAs em geral, reprimem a expressão do gene

ligando-se a um alvo de mRNA complementar, mediando assim a inibição, a degradação ou a clivagem da tradução (Bartel, 2004; 2009).

Diversos estudos têm estabelecido uma rede bioquímica e reguladora de genes mediada por miRNAs, e associado os miRNAs e seus genes-alvos em diferentes fases do desenvolvimento das plantas, em respostas a estresses bióticos e abióticos e ao controle da homeostase de nutrientes. Hipotetizou-se a participação de miRNAs em três vias de transdução de sinal: a via de sinalização dependente de etileno e ABA, a via de sinalização de auxina e a via de resposta ao estresse oxidativo mediada pela cupredoxina (Sharma *et al.*, 2017).

Desde que foi relatada a primeira identificação de miRNA em soja por Subramaniam e colaboradores em 2008, que identificaram 35 famílias de miRNAs durante a simbiose com *B. japonicum*; um rápido avanço ocorreu, e atualmente existem 756 sequência de miRNAs maduros relatados no banco de dados miRBase (www.miRBase.org).

Estudos com diferentes espécies em condição de hipóxia tem identificado mudanças na abundância de miRNAs associadas a essa condição. Em *Arabidopsis*, Moldovan e colaboradores (Moldovan *et al.*, 2009) identificaram 46 miRNAs de 19 famílias expressos em raízes sob condição de hipóxia, entre eles miR159, miR166, miR167, miR168, miR169 e miR172. Alguns desses miRNAs também foram encontrados em raízes de milho sob longo (Zhai *et al.*, 2013) e curto período de alagamento (Liu *et al.*, 2012), entretanto com diferentes genes alvos, indicando que a regulação de miRNA na condição de hipóxia pode ser espécie-específica.

Em soja, muitos estudos têm relacionado miRNAs com a resposta a diferentes estresses abióticos tais como salinidade (Li *et al.*, 2011), seca (Kulcheski *et al.*, 2011), toxidez por alumínio (Zeng *et al.*, 2012) e bióticos tais como ferrugem asiática (Kulcheski *et al.*, 2011), nematóide (Li *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2017) e *Phytophthora* (Guo *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2014), além de miRNAs envolvidos na nodulação e na fixação de nitrogênio (Yan *et al.*, 2015; 2016). Entretanto, para a condição de hipóxia em soja, ainda não foi relatado nenhum estudo que contemplasse o perfil de miRNAs expressos sob deficiência de O₂.

1.3.6 Origem e evolução dos miRNAs em plantas

Existem mecanismos diferentes propostos para a origem evolutiva dos genes de miRNA. O primeiro mecanismo propõe que os genes de miRNA se originaram principalmente pela duplicação de genes codificadores de proteínas. Essa hipótese é atrativa pois o gene de miRNA gerado se ligaria à transcrição do gene que codifica a proteína que o originou. No segundo mecanismo proposto, elementos transponíveis poderiam gerar genes de miRNA; em particular, as miniaturas de elementos transponíveis de repetição invertida. Segundo esta teoria, estes elementos apresentam este potencial, pois eles possuem uma sequência interna curta que se dobraria na estrutura de *hairpin* dos miRNAs (Nozawa *et al.*, 2012; Cui *et al.*, 2017).

Os íntrons também são considerados regiões do genoma ideais para o surgimento de novos miRNAs, pois são regiões desestruturadas que favorecem a formação de *hairpins*; não necessitam de unidade transcricional, pois utilizam a do gene hospedeiro, e portanto são transcritas com o gene, o que favorece o início da fixação do miRNA como funcional, e sofrem *splicing*, o que facilita a biogênese do miRNA (Tang *et al.*, 2010).

Um terceiro mecanismo sugere que novos genes de miRNA são gerados pela duplicação de genes preexistentes de miRNAs com mutações. Este mecanismo parece ser importante em plantas uma vez que cada família de genes de miRNA consiste em vários genes de miRNA. No último mecanismo proposto, os genes de miRNA se originariam naturalmente por mutações espontâneas de estruturas em *hairpin* no genoma (Nozawa *et al.*, 2012; Cui *et al.*, 2017).

De modo geral, os mecanismos de duplicação de DNA promovem a expansão de famílias de miRNA no genoma. As famílias compreendem os genes de miRNAs com sequências homólogas e transcritos maduros com regiões *seed* idênticas. Os membros das famílias de miRNA com sequências parálogas surgiram predominantemente pelo processo de duplicação gênica (Tang, 2010).

Nozawa e colaboradores examinaram *in silico* o genoma de onze espécies vegetais, incluindo a soja, para identificar genes putativos de miRNA e suas mudanças evolutivas, e concluíram que os genes de miRNA se originaram principalmente pela duplicação de genes de miRNA preexistentes ou genes codificadores de proteínas. Também os elementos transponíveis parecem ter contribuído para a geração de genes específicos de miRNAs. Os genes de miRNA foram encontrados espalhados por todo o

genoma, sendo que 84% estão localizados em regiões intergênicas, entretanto, não foi encontrada correlação entre a proporção de genes de miRNAs intergênicos e o tamanho do genoma da planta (Nozawa *et al.*, 2012).

Também neste estudo, foram identificados muitos genes parálogos em cada espécie, localizados em cromossomos diferentes, sugerindo rearranjos cromossômicos extensos após a duplicação de genes de miRNA. E ainda, foi constatado que existem muitos genes de miRNAs específicos de linhagens ou espécies (Nozawa *et al.*, 2012).

Em geral, supõem-se que os genes de miRNAs evoluem de maneira mais conservadora que seus genes alvos; isso ocorre porque os genes de miRNA podem regular a expressão de vários genes simultaneamente, o que pode ser prejudicial para um indivíduo. Por outro lado, as mudanças nos sítios alvos só podem afetar o gene alvo, de modo que o efeito fenotípico das mudanças pode ser menor (Nozawa *et al.*, 2012). Entretanto, em função dos complexos efeitos combinados que muitos miRNAs exercem sobre a regulação gênica, é comum observar uma co-evolução entre os miRNAs e seus alvos (Zhao *et al.*, 2015).

Liu e colaboradores investigaram a co-evolução de genes de miRNA e seus alvos durante a domesticação da soja e constataram que muitos fatores influenciaram a evolução dos genes de miRNA e de seus alvos, incluindo a condição de duplicação, o nível de expressão e as interações entre o miRNA e seu alvo (Liu *et al.*, 2016).

Evolutivamente, os miRNAs podem ser classificados como conservados ou não-conservados, embora esta definição não reconheça os vários graus de conservação demonstrados nos miRNAs conhecidos. Os miRNAs conservados são abundantes e demonstram baixa variação de sequência em diversas famílias de plantas, com papéis e alvos fortemente restritos. Eles predominantemente têm como alvo genes envolvidos no desenvolvimento das plantas e respostas a estresses que emergiram ou precederam a evolução das plantas terrestres (Balderich *et al.*, 2018).

Em contraste, os miRNAs não conservados são específicos da linhagem, e comumente funcionam em vias de adaptação a ambientes, vias bioquímicas únicas ou de processos restritos a espécies. Acredita-se que esses miRNAs ocorram em menor abundância, uma vez que podem ainda não ter sido integrados fortemente em uma determinada rede, bem como, algumas famílias de miRNAs não-conservados podem não ser funcionais e ser evolutivamente transitórios (Balderich *et al.*, 2018).

Em plantas, foi observado que o repertório de genes de miRNA modificou-se dinamicamente durante a evolução, e o número de miRNAs específicos da linhagem

mudou após a divergência entre eudicotiledôneas e monocotiledôneas, sendo os genes jovens de miRNAs menos conservados quando comparados aos genes antigos (Nozawa *et al.*, 2012).

1.3.7 Organização genômica de miRNAs em plantas

Em relação a localização genômica, os miRNAs podem ser classificados de três formas distintas; miRNAs intergênicos, miRNAs intrônicos e miRNAs exônicos, sendo que os miRNAs intrônicos e exônicos são também conhecidos como intragênicos (Olena e Patton, 2010).

Os miRNAs intergênicos encontram-se entre unidades transcricionais e sua expressão é regulada por seu próprio promotor, que possui os elementos característicos como o sítio de início de transcrição e regiões regulatórias. Apresentam ainda ilhas CpG adjacentes aos genes de miRNA com características espécies-específicas (Olena e Patton, 2010). A maioria dos genes de miRNAs de plantas estão localizadas em regiões intergênicas. Especificamente em soja, foi relatado que 97% do total de genes de miRNA identificados em uma biblioteca de pequenos RNAs de raízes de soja inoculada com *Bradyrhizobium japonicum* encontravam-se em regiões intergênicas (Turner *et al.*, 2012).

Os miRNAs intrônicos encontram-se em um íntron de uma unidade transcricional e em geral utilizam-se dos mesmos promotores dessa unidade transcricional, podendo em alguns casos ter sua sequência precursora (pre-miRNA) do mesmo tamanho do íntron, e dessa forma após a transcrição e processamento de seu RNA hospedeiro, os íntrons removidos formam diretamente o pre-miRNA não sendo necessárias as etapas iniciais de biogênese, tornando-os independente da clivagem pela enzima Drosha. O miRNA gerado nessa via não canônica é chamado de miRtron (Okamura *et al.*, 2007).

Geralmente os miRNAs intrônicos apresentam expressão similar a do seu gene hospedeiro. E, em alguns casos, atuam em vias correlacionadas, podendo os genes-alvos desses miRNAs atuarem de maneira antagônica na via do gene hospedeiro, e desta forma, podem ser completamente inibidos por seus miRNAs intrônicos. Por outro lado, alvos que atuam de maneira sinérgica ao gene hospedeiro do miRNA intrônico possuem um ajuste fino, proporcionando um controle preciso de processos biológicos em que atuam esses genes hospedeiros e seus miRNAs intrônicos (Lutter *et al.*, 2010).

Os miRNAs exônicos são encontrados no final de um éxon estendendo-se para o íntron adjacente, compartilham o promotor do seu gene hospedeiro, e possuem frequência baixa ou nula entre as espécies, isso porque sua localização interfere no correto processamento do pré-miRNA acabando por inibir sua própria biogênese ou também de seu gene hospedeiro (Olena e Patton, 2010).

Os miRNAs também podem se arranjar em *tandem* em determinada região genômica, ou seja, diversos genes de miRNA distribuídos de forma sequencial e contígua; esse conjunto de genes de miRNA é chamado de *cluster*. Esses miRNAs podem atuar em processos biológicos semelhantes ou auxiliando em processos biológicos complementares ao processo principal. Há uma maior expressão de *clusters* de miRNAs em plantas eudicotiledôneas em relação às monocotiledôneas (Zhang *et al.*, 2009). No esquema a seguir estão representados as diferentes organizações dos miRNAs de acordo com a sua posição no genoma (Figura 3).

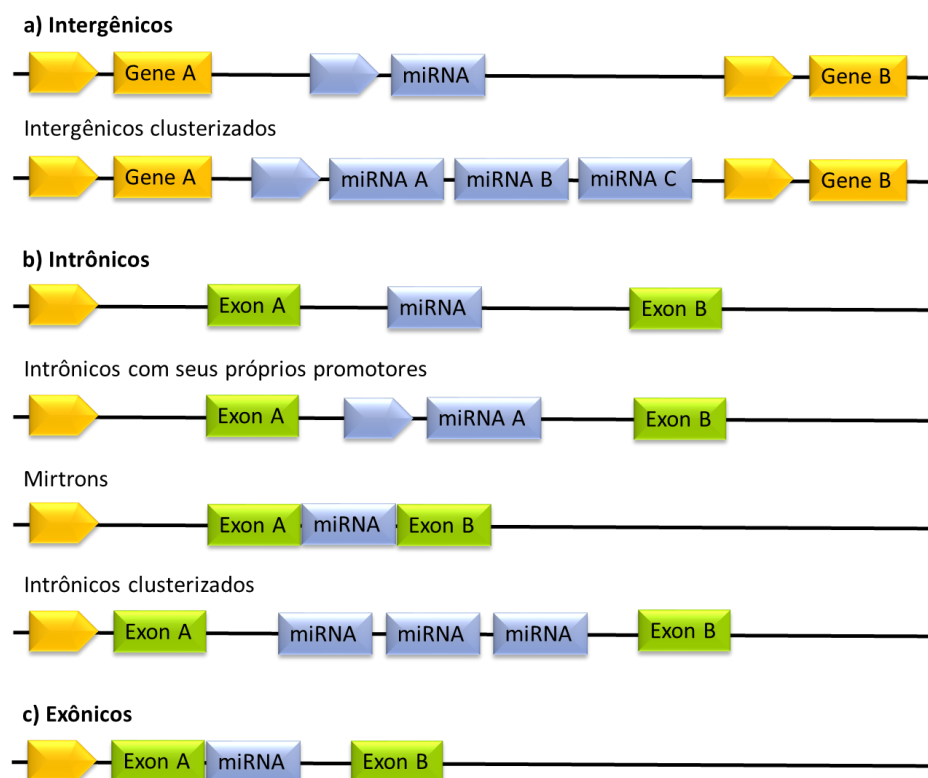


Figura 3. Organização genômica dos miRNAs. De acordo com a posição no genoma os miRNAs podem ser classificados como intergênicos, intrônicos e exônicos. Setas indicam região promotora.

1.3.8 Estrutura do gene de miRNAs

Os genes de miRNA possuem uma estrutura similar a genes codificadores de proteína, que consiste de um promotor, uma região transcrita e um terminador. Os promotores de miRNA possuem os elementos *core TATA box* e *CAT box*, bem como sítios de ligação a fatores de transcrição específicos; e regulam a expressão de maneira tecido ou temporalmente específica. A maioria dos miRNAs de plantas regulam a expressão de fatores de transcrição. Alguns miRNAs, como miR156 e miR172, possuem em seus promotores os sítios de ligação dos seus fatores de transcrição alvos, atuando como autoregulador, e demonstrando o papel de miRNAs em suas redes regulatórias (Wu *et al.*, 2009).

Existe ainda, uma correlação entre a atividade do promotor de miRNA com a de seus genes alvo, que resultaria numa regulação diferencial dos genes alvo. Neste caso, os promotores de miRNA partilham atividades parcialmente sobrepostas, mas não idênticas as dos seus genes alvo, de modo a serem expressos exclusivamente ou a níveis mais elevados quando e onde o gene miRNA não é expresso. Dessa forma, apesar de certos genes alvo de miRNA preditos terem um sítio perfeitamente complementar ao miRNA, eles não podem ser alvo do miRNA devido a seus padrões de expressão não sobrepostos (Tang, 2010).

A região transcrita de um gene de miRNA é geralmente mais longa do que o miRNA maduro e de seu precursor (pre-miRNA). Ainda não foi elucidado a função dessas regiões estendidas além do pre-miRNA, mas algumas explicações possíveis são propostas: a) esta região pode ser um traço evolutivo que reflete a gênese original do miRNA de seu gene alvo, sem funções particulares; b) pode ter papel regulador na estabilidade do pri-miRNA (MicroRNA primário), beneficiando a biogênese do miRNA e c) ainda pode conter informações para a regulação da transcrição do gene de miRNA (Tang, 2010).

A existência da região terminadora de genes de miRNA é inferida a partir do fato de que pri-miRNAs são poliadenilados, porém ainda não se sabe exatamente como terminadores ou cauda poliA afetam a biogênese do miRNA ou a estabilidade do pri-miRNAs (Tang, 2010).

1.3.9 Biogênese dos miRNAs de plantas

Como já descrito, existem diversas possibilidades para o surgimento e evolução de novos genes de miRNA no genoma. Os miRNAs podem se originar por mecanismos de duplicação de DNA (duplicação gênica e genômica), por modificações em RNAs não codificadores, processo denominado *de novo*; através de mutações pontuais em pseudogenes, snoRNAs (pequenos RNAs nucleolar) e tRNAs (RNA transportador) e ainda à partir de elementos transponíveis e íntrons (Tang, 2010; Nozawa *et al.*, 2012; Cui *et al.*, 2017).

No processo de biogênese de miRNA, independente do mecanismo, o pré-requisito básico para que um miRNA seja funcional é a formação de uma estrutura secundária em forma de *hairpin* por seu transcrito precursor. Esta estrutura é essencial pois todas as enzimas envolvidas no processo de biogênese de um miRNA reconhecem e dependem dessa estrutura para gerar o miRNA funcional.

A via canônica da biogênese de um miRNA compreende todos os eventos desde a transcrição, maturação até a incorporação do miRNA no complexo RISC. Existem algumas diferenças importantes entre o processamento de pri-miRNA de plantas e animais. Em plantas não existe a enzima Droscha e a clivagem do pri-miRNA é realizada pela enzima Dicer. Também há diferença no local onde ocorre a clivagem do pré-miRNA; em plantas a clivagem ocorre no núcleo e em animais no citoplasma (Strubberg, e Madison, 2017).

Os genes de miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II (RNA pol II) em uma cadeia dupla de RNA em forma de *hairpin* denominado miRNA primário (pri-miRNA). Os pri-miRNA são longos precursores de tamanho variado e que possuem 7-metilguanossina (CAP) na região 5' e poliadenilização na região 3' (Axtel *et al.*, 2011) (Figura 3).

O pri-miRNA é processado por um complexo proteico que compreende as enzimas Dicer DCL1 (*Dicer-Like1*), dsRBP1 (*DsRNA Binding Protein1*), além das proteínas SE (*SERRATE*), TGH (*TOUGH*), CPL1 (*C Terminal Domain Phosphatase Like1*) e DDL (*DAWDLE*), que clivam os braços do pri-miRNA e formam a estrutura dupla fita de miRNA precursora em forma de *hairpin* denominada pre-miRNA que possui de 60 a 100 nucleotídeos. O processamento de pre-miRNA com a remoção do *hairpin*, também acontece no núcleo e é realizado pelo complexo DCL1 com a

participação da proteína HEN1 (*Hua-Ehancer1*) que promove a metilação do pre-miRNA (Axtel *et al.*, 2011) (Figura 3).

O miRNA produzido de aproximadamente 22 nucleotídeos é exportado para o citoplasma pela proteína HST (*HASTY*), e em seguida uma das fitas geradas é acoplada a proteína da família Argonata AGO1 preferencialmente, formando o complexo funcional miRISC (Figura 4).

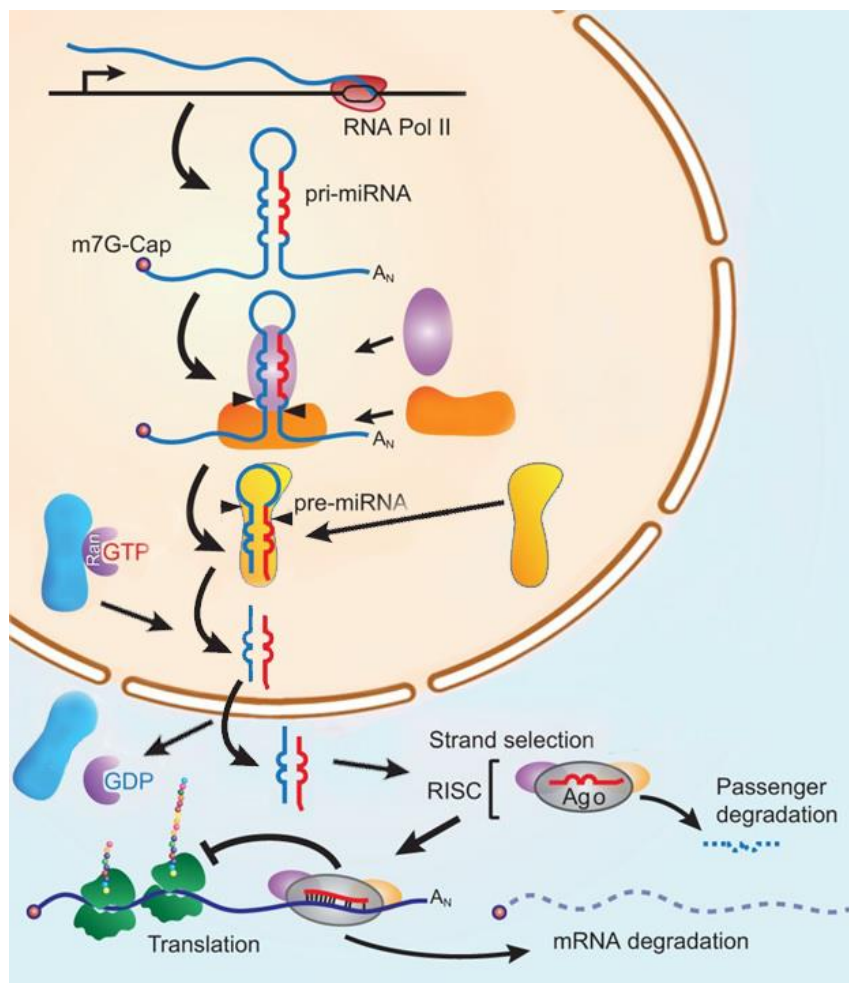


Figura 4. Biogênese de miRNA em plantas. O miRNA primário (pri-miRNA) é transcrito no núcleo, então é processado por um conjunto de enzimas associado a DCL (*Dicer-Like1*) formando o pré-miRNA que por sua vez é processado por outro complexo enzimático, formando o miRNA maduro que é exportado para o citoplasma pela proteína HST. No citoplasma, o miRNA maduro se associa a um complexo de enzimas chamado RISC e reprime ou inibe a síntese de proteínas pela clivagem (quebra) de RNAs mensageiros (mRNA) ou pode impedir a leitura do mRNA (impedir a tradução) inibindo a produção de proteínas. Adaptado de Strubberg, e Madison, 2017.

Existem mecanismos de diversificação associados à biogênese dos miRNAs que alteram a expressão quantitativa e qualitativa desses genes. Estes mecanismos

moleculares podem contribuir para um aumento na diversidade do repertório de miRNAs maduros e, como consequência, podem produzir alterações fenotípicas. Dentre os mecanismos destacam-se:

- a) alteração na região *seed* e isomiRs (isômeros),
- b) mudança de braço de leitura (*arm switching*),
- c) mudança na estrutura em forma de grampo (*hairpin shifting*), e finalmente,
- d) edição de miRNAs.

As sequências *seeds* são regiões constituídas pelos nucleotídeos da posição 2 a 8 da extremidade 5' do miRNA, onde se inicia a hibridização entre o miRNA e seu alvo, e são portanto responsáveis pela especificidade e funcionalidade do miRNA sobre o seu mRNA alvo. A adição e/ou subtração de nucleotídeos nos terminais 5' ou 3' do miRNA maduro pode produzir múltiplas formas variantes de miRNA denominadas isomiRs (Sablock *et al.*, 2015).

Alterações no terminal 5' são consideradas críticas pois podem influenciar na atividade do miRNA, criando novas possibilidades de regulação. Mudanças nos isomiRs 5' podem em teoria ter diferentes transcritos como alvo (Sablock *et al.*, 2015). Devido a essa característica isomiRs 5' são menos comuns que isomiRs 3' (Berezikov *et al.*, 2011). Os isomiRs podem desencadear um processo evolutivo e contribuir para a diversidade de miRNAs, no entanto, a real contribuição dos isomiRs no repertório funcional de um gene de miRNA ainda não está completamente elucidada, mas estudos demonstram que isomiRs conferem maior robustez na regulação do mRNA alvo por um miRNA canônico (Ahamed *et al.*, 2014).

Novos miRNAs podem também se originar por alterações no braço de leitura (5p e/ou 3p), promovendo uma alteração no duplex de miRNA que forma o complexo funcional miRISC, ou seja, o braço que seria descartado passa a formar o miRNA maduro. Na mudança do braço de leitura não há alteração da sequência precursora em forma de *hairpin*. Todavia, eventos que promovem a mudança no *hairpin* também alteram a biogênese de miRNAs, e neste caso, todo *hairpin* é reconfigurado. A seleção dos diferentes braços pode variar entre diferentes tecidos, estágios de desenvolvimento e espécies. Além disso, loci homólogos de miRNA podem desempenhar funções discrepantes devido ao padrão de expressão diferencial de um dos dois braços (Guo *et al.*, 2014)

1.3.10 Mecanismos de ação de miRNAs

Os miRNAs direcionam os complexos de silenciamento induzidos por RNA (RISCs) para seus locais-alvo complementares nos mRNAs após a ligação às proteínas Argonautas (AGO). Os RISCs regulam a expressão gênica do alvo através de cinco diferentes mecanismos:

- 1) Desestabilização do transcrito alvo,
- 2) Inibição da tradução,
- 3) Silenciamento transcricional,
- 4) Promoção da transcrição e,
- 5) Intensificação da tradução.

No mecanismo de desestabilização do transcrito alvo, a expressão do mRNA é reduzida, devido a clivagem e a degradação imediata do mRNA. Os miRNAs são quase sempre perfeitamente complementares aos locais na região de codificação, bem como na 3'-UTR, e mesmo na 5'-UTR. No entanto, alguns desses locais-alvo só estão presentes após a maturação do mRNA, uma vez que abrangem os limites intron/exon. A desestabilização do transcrito alvo pode ocorrer pela remoção da cauda poli-A e do 5' CAP. Principalmente em plantas, a clivagem ocorre em um sítio específico do RNA alvo que corresponde aos nucleotídeos 10 e 11 (Palatinik *et al.*, 2003).

O mecanismo de inibição da tradução afeta diretamente a eficiência da tradução da proteína. Neste mecanismo os miRNAs podem atuar interferindo no reconhecimento do 5' CAP e impedindo o início da tradução (Pillai *et al.*, 2005) pela inibição da montagem dos ribossomos (Chendrimada *et al.*, 2007) ou promovendo a dissociação prematura dos ribossomos, pois os miRNAs tornariam os polissomos menos estáveis (Petersen *et al.*, 2006). Alguns miRNAs atuam impedindo a interação do 5' CAP com a cauda poli-A, e portanto, a circularização do mRNA, evento essencial para início da tradução. Ainda, os miRNAs podem atuar reduzindo a velocidade da elongação durante a síntese proteica (Maroney *et al.*, 2006). E também, promovendo a proteólise durante a fase de elongação, degradando a cadeia polipeptídica nascente no ribossomo (Nottrott *et al.*, 2006).

O mecanismo de silenciamento transcricional é observado em plantas e animais. Em plantas pode ocorrer pela metilação do DNA desencadeada por miRNAs mais longos, de 24 nucleotídeos, no próprio locus MIR e em seus genes alvos (Wu *et al.*, 2010). Em animais, esse mecanismo ocorre por modificações na cromatina.

Recentemente, foi relatado que os miRNAs podem também interferir na maquinaria de iniciação de transcrição, intensificando esse processo (Zhang *et al.*, 2014). Outro mecanismo imprevisto de ação dos miRNAs é a intensificação da tradução. Um estudo evidenciou que alguns miRNAs podem promover uma transição entre repressão e ativação da tradução dependendo do estado celular (Vasudevan *et al.*, 2007).

A princípio, nada parece impedir que os miRNAs regulem também RNAs não codificantes e até mesmo outros miRNAs. Um estudo conduzido com *Arabidopsis thaliana* sugere que miRNAs podem se ligar a alvos falsos em outros RNAs não-codificadores, estabelecendo assim um mecanismo de regulação negativa da atividade do miRNA (Franco-Zorrilla *et al.*, 2007).

1.3.11 Nomenclatura dos miRNAs de plantas

Alguns critérios devem ser observados para se definir a nomenclatura dos miRNAs, pois além de distinguir miRNAs de outros pequenos RNAs, a nomenclatura consistente é igualmente importante para evitar redundâncias ou erros de anotação. Atualmente, o banco de dados miRBase (www.miRBase.org) atua como árbitro da nomenclatura do gene de miRNA, atribuindo nomes antes da publicação de novas sequências de miRNA (Budak *et al.*, 2015).

Como regra básica, a espécie onde o miRNA foi identificado, é indicada com o uso de três caracteres em minúsculo, normalmente proveniente do nome científico. No caso de soja utiliza-se **gma**. O prefixo **mir** é usado para designar os *loci* genômicos que codificam miRNA, bem como os pre-miRNA, enquanto o prefixo das formas maduras são abreviados utilizando a letra R em maiúsculo, ou seja, **miR**. Ambas designações são seguidas de um único número de identificação. Os miRNAs de animais têm um hífen precedendo o número para distinguí-los dos miRNAs de plantas. Para diferenciar o *locus* genômico do pré-miRNA utiliza-se a forma itálica na grafia dos *locis*. Entretanto, em plantas o pré-miRNA é indicado com todas as letras em maiúsculo **MIR** (Griffiths-Jones *et al.*, 2007).

Em diferentes genomas eucariotos, alguns *loci* apresentam miRNA na fita *sense* sobreposto a miRNA na fita *antisense*, que podem ou não apresentar os mesmos alvos e funções, e para diferenciar os *loci* que expressam sequências de miRNA maduras relacionadas utiliza-se letras minúsculas como sufixos (a, b, c, etc). Também para

diferenciar as sequências maduras idênticas dos miRNAs que se originaram de genes de miRNA parálogos, acrescenta-se mais um hífen e um número. Em plantas é diferente, pois nunca se utilizam sufixos numéricos para nomenclatura de miRNA vegetais, e sim letras minúsculas. Outro critério é a utilização dos sufixos 5p ou 3p para indicar a extremidade do pré-miRNA que originou a forma madura (Griffiths-Jones *et al.*, 2007). Assim, por exemplo o miRNA denominado: **gma-miR1510b-5p** indica um miRNA maduro de soja que foi originado da porção 5' do braço precursor e que possui outros miRNAs com sequências homólogas.

Em relação aos genes de miRNA que estão presentes no mesmo *cluster*, e portanto expressos em um único transcrito policistrônico, a nomenclatura de cada gene de miRNA segue uma numeração em ordem crescente do sentido 5' para 3'. Deve-se considerar que os genes de miRNAs presentes num mesmo *cluster* conservado entre diferentes espécies podem conter miRNAs maduros com papéis funcionais independentes.

O agrupamento dos miRNAs em famílias com base na ancestralidade comum de sequências, estruturas e funções impacta diretamente na nomenclatura dos miRNAs. A classificação de miRNAs em famílias não é simples, pois os critérios divergem entre autores. Alguns consideram família como um conjunto de miRNAs que compartilham as sequências *seeds*, região entre o primeiro e oitavo nucleotídeos da extremidade 5' do miRNA, requerida para o reconhecimento de alvos; enquanto outros usam a conservação das sequências precursoras e maduras, estruturas secundárias, localização genômica, correção e participação em processos biológicos e vias metabólicas comuns entre espécies para agrupar miRNAs em famílias. Outro ponto importante na classificação de famílias é que, um mesmo miRNA precursor pode gerar mais de uma sequência distinta de miRNA maduro a partir da mesma extremidade, que podem não compartilhar alvos ou funções comuns (Meyers *et al.*, 2008; Budak *et al.*, 2015).

Apesar de informativo, os nomes de miRNA não devem ser usados para transmitir informações complexas de relacionamento, pois os critérios de nomenclatura podem ser redefinidos sutilmente ao longo do tempo, e o entendimento sobre o grau de conservação da sequência madura necessária para a redundância funcional pode ser alterado à medida que novos estudos são realizados (Griffiths-Jones *et al.*, 2007; Meyers *et al.*, 2008; Budak *et al.*, 2015).

1.3.12. Ferramentas de bioinformática para análises de miRNAs

A função dos miRNAs pode ser em grande parte compreendida pela identificação de seus genes alvo, que pode ser feita *in silico*, pela predição computacional dos alvos ou experimentalmente por métodos moleculares.

A predição computacional permite buscar a partir de sequências de miRNA os possíveis alvos em bancos de genoma ou transcriptoma. É possível também verificar se um determinado transcrito pode ser regulado por miRNAs conhecidos, todavia, a análise *in silico* pode gerar um grande número de falsos positivos devido as particularidades do modo de ação dos miRNAs (Alptekin et al., 2017).

Devido a relevância dos miRNAs na regulação da expressão gênica, e a crescente quantidade de dados gerados, uma variedade de ferramentas de bioinformática foram desenvolvidas para gerenciar o fluxo de montagem de dados, desde a identificação dos genes de miRNAs e previsão de alvos até sua implicação funcional (Akhtar *et al.*, 2015). Porém, muitas ferramentas de análise não se estabelecem e acabam desatualizadas, fato que deve ser considerado no momento da escolha da ferramenta de análise a ser empregada.

No desenvolvimento de ferramentas de análise de miRNAs são aplicados princípios similares tanto para plantas quanto para animais, com abordagens distintas considerando as características que diferem os miRNAs entre os domínios. Embora várias ferramentas possam ser utilizadas para prever miRNAs em animais e plantas, a quantidade de métodos propostos para plantas é bem inferior em relação aos animais, em parte devido à natureza heterogênea dos miRNAs em plantas, que variam muito em tamanho e estrutura (Mendes *et al.*, 2009).

Os métodos que utilizam apenas critérios de conservação são incapazes de identificar miRNAs com padrões menos óbvios de conservação evolutiva, enquanto os métodos que consideram a complementaridade entre o miRNA e os sítios alvo correspondentes nos mRNAs das plantas são capazes de identificar novos miRNAs não conservados da planta. Apesar dos métodos se concentrarem na estrutura do miRNA, um determinado local no genoma não pode ser considerado um miRNA se não for transcrito de forma eficiente e não regular um gene alvo de maneira fisiologicamente relevante. Assim, o aprimoramento das ferramentas computacionais está intimamente ligado à pesquisa biológica experimental e vice-versa. (Mendes *et al.*, 2009).

Akhtar e colaboradores analisaram 129 ferramentas de bioinformática utilizadas nas análises de miRNA. A maioria das ferramentas contém informações heterogêneas, e a seleção da ferramenta mais adequada depende das necessidades específicas de cada estudo. Atualmente, as ferramentas disponíveis possibilitam a detecção de miRNA, a predição do alvo de miRNA, a identificação de miRNA validados, a análise da expressão de miRNA, a identificação de redes regulatórias de miRNA, a análise de vias metabólicas e de sinalização de miRNA, a investigação de interação de miRNA e fator de transcrição e a ligação de miRNAs com doenças (Akhtar *et al.*, 2015).

O psRNATarget é uma ferramenta desenvolvida para análise de alto rendimento de RNA alvo de plantas a partir de dados de sequenciamento NGS (*Next Generation Sequencing*). Esta plataforma analisa a correspondência complementar reversa entre miRNA e o transcrito alvo, com base na análise de pontuação de complementaridade e na análise da estrutura secundária. O psRNATarget diferencia a inibição translacional e pós-transcricional e relata o número de pares de miRNA / sítio alvo que podem afetar a atividade de ligação do miRNA ao transcrito alvo (Dai *et al.*, 2018).

A ferramenta miRDeep é amplamente utilizada para determinar o perfil de expressão de genes de miRNA conhecidos e novos a partir de dados de RNAseq. O miRDeep-P foi desenvolvido através da modificação do miRDeep, que é baseado em um modelo probabilístico de biogênese de miRNA em animais, com um sistema de pontuação específico de planta e critérios de filtragem, e se apresenta como uma ferramenta eficaz e de fácil utilização para caracterizar o transcriptoma de miRNA em plantas (Yang e Li, 2011).

Em relação a anotação de miRNAs, o miRBase (www.miRBase.org) é o repositório central online para anotações de miRNAs em todas as espécies estudadas (Kozomara e Griffiths-Jones, 2014). Seus objetivos primários são atribuir nomenclatura consistente aos *loci* de miRNA e permitir fácil acesso da comunidade a todos os miRNAs conhecidos e suas sequências, anotação e previsão de alvo. Atualmente, o miRBase está na versão 21, contendo 6.942 anotações de miRNAs de 72 espécies diferentes de plantas terrestres; entretanto a última atualização registrada ocorreu a mais de três anos (Axtell *et al.*, 2018). Os miRNAs no banco de dados representam atualmente o consenso da sequência mais predominantemente expressa.

1.4. Referências Bibliográficas

AGRIMEC, Agrimec Agro Industrial e Mecânica Ltda. Rotação de culturas: O sucesso conquistado com o arroz e a soja. Disponível em <https://agrimec.com.br/blog/rotacao-de-culturas-o-sucesso-conquistado-com-o-arroz-e-a-soja/> Acessado em outubro 2018

AHMED, Firoz *et al.* Comprehensive analysis of small RNA-seq data reveals that combination of miRNA with its isomiRs increase the accuracy of target prediction in *Arabidopsis thaliana*. *RNA biology*, v. 11, n. 11, p. 1414-1429, 2014.

AINSWORTH, Elizabeth A. *et al.* The effects of tropospheric ozone on net primary productivity and implications for climate change. *Annual review of plant biology*, v. 63, p. 637-661, 2012.

AKHTAR, Most Mauluda *et al.* Bioinformatic tools for microRNA dissection. *Nucleic acids research*, v. 44, n. 1, p. 24-44, 2015.

ALPTEKIN, Burcu; AKPINAR, Bala A.; BUDAK, Hikmet. A comprehensive prescription for plant miRNA identification. *Frontiers in plant science*, v. 7, p. 2058, 2017.

ARRU, Laura; FORNACIARI, Silvia; MANCUSO, Stefano. New insights into the metabolic and molecular mechanism of plant response to anaerobiosis. In: *International review of cell and molecular biology*. Academic Press, p. 231-264, 2014.

ASHBURNER, Michael *et al.* Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature genetics*, v. 25, n. 1, p. 25, 2000.

AUGUSTINE, Rehna *et al.* Translational genomics in Brassica crops: challenges, progress, and future prospects. *Plant biotechnology reports*, v. 8, n. 2, p. 65-81, 2014.

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

AXTELL, Michael J.; WESTHOLM, Jakub O.; LAI, Eric C. Vive la différence: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome biology*, v. 12, n. 4, p. 221, 2011.

BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L. A. C. J. Flooding stress: acclimations and genetic diversity. *Annu. Rev. Plant Biol.*, v. 59, p. 313-339, 2008.

BAILEY-SERRES, Julia *et al.* Making sense of low oxygen sensing. *Trends in plant science*, v. 17, n. 3, p. 129-138, 2012.

- BALDRICH, Patricia; BERIC, Aleksandra; MEYERS, Blake C. Despacito: the slow evolutionary changes in plant microRNAs. *Current opinion in plant biology*, v. 42, p. 16-22, 2018.
- BANTI, Valeria *et al.* Low oxygen response mechanisms in green organisms. *International journal of molecular sciences*, v. 14, n. 3, p. 4734-4761, 2013.
- BARTEL, David P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*, v. 116, n. 2, p. 281-297, 2004.
- BARTEL, David P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *cell*, v. 136, n. 2, p. 215-233, 2009.
- BEN-NOAH, Ilan; FRIEDMAN, Shmulik P. Review and evaluation of root respiration and of natural and agricultural processes of soil aeration. *Vadose Zone Journal*, v. 17, n. 1, 2018.
- BEREZIKOV, Eugene. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nature Reviews Genetics*, v. 12, n. 12, p. 846, 2011.
- BUDAK, Hikmet *et al.* MicroRNA nomenclature and the need for a revised naming prescription. *Briefings in functional genomics*, v. 15, n. 1, p. 65-71, 2015.
- CHEESEMAN, John. Food security in the face of salinity, drought, climate change, and population growth. In: *Halophytes for Food Security in Dry Lands*. p. 111-123, 2016.
- CHENDRIMADA, Thimmaiah P. *et al.* MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature*, v. 447, n. 7146, p. 823, 2007.
- COLMER, T. D.; VOESENEK, L. A. C. J. Flooding tolerance: suites of plant traits in variable environments. *Functional plant biology*, v. 36, n. 8, p. 665-681, 2009.
- Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB . *Perspectivas para a agropecuária*, Brasília, DF: CONAB, v. 6, safra 2018/2019, 2018. Disponível em <<https://www.conab.gov.br/images/arquivos/outros/Perspectivas-para-a-agropecuaria-2018-19.pdf>>. Acessado em 23 de fevereiro 2019.
- CUI, Jie; YOU, Chenjiang; CHEN, Xuemei. The evolution of microRNAs in plants. *Current opinion in plant biology*, v. 35, p. 61-67, 2017.
- DAI, Xinbin; ZHUANG, Zhaohong; ZHAO, Patrick Xuechun. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic acids research*, 2018.
- DAS, A.; PARIDA, S. K. *Advances in biotechnological applications in three important food legumes*; Plant Biotechnology Reports, ISSN: 1863-5466; 2013

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. Soja em números (Safrá 2017/2018). Disponível em <https://www.embrapa.br/en/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>. Acessado em 22 de março de 2019.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. The Impact of Disasters on Agriculture and Food Security, 2015.

FELLE, Hubert H. pH regulation in anoxic plants. *Annals of Botany*, v. 96, n. 4, p. 519-532, 2005.

FIELD, C., VICENTE BARROS, T. STOCKER, DAHE QIN, D. DOKKEN, K. EBI, M. MASTRANDREA et al. "IPCC, 2012: Managing the risks of extreme events and disasters to advance climate change adaptation. A special report of Working Groups I and II of the Intergovernmental Panel on Climate Change." Cambridge University Press, Cambridge, UK, and New York, NY, USA 30, n. 11 p. 7575-7613, 2012.

FRANCO-ZORRILLA, José Manuel *et al.* Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nature genetics*, v. 39, n. 8, p. 1033, 2007.

GASCH, Philipp *et al.* Redundant ERF-VII transcription factors bind an evolutionarily-conserved cis-motif to regulate hypoxia-responsive gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, p. TPC2015-00866-RA, 2015.

GAZZONI, D. L.; DALL'AGNOL, A. A saga da soja: de 1050a.C a 2050 d.C., Brasília. DF: Embrapa, 199p, 2018

GRIFFITHS-JONES, Sam *et al.* miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic acids research*, v. 36, n. suppl_1, p. D154-D158, 2007.

GUO, Li *et al.* Selected isomiR expression profiles via arm switching?. *Gene*, v. 533, n. 1, p. 149-155, 2014.

GUO, Na *et al.* Microarray profiling reveals microRNAs involving soybean resistance to *Phytophthora sojae*. *Genome*, v. 54, n. 11, p. 954-958, 2011.

HIRABAYASHI, Y., MAHENDRAN, R., KOIRALA, S., KONOSHIMA, L., YAMAZAKI, D., WATANABE, S., KIM, H. AND KANAE, S. Global flood risk under climate change. *Nature Climate Change*, 3(9), p.816, 2013.

IRFAN, Mohd *et al.* Physiological and biochemical changes in plants under waterlogging. *Protoplasma*, v. 241, n. 1-4, p. 3-17, 2010.

IRGA (INSTITUTO RIO GRANDENSE DO ARROZ). Disponível em: <https://irga-admin.rs.gov.br/upload/arquivos/201810/24143018-soja-em-rotacao-com-arroz.pdf>. Acesso em: 20 fevereiro 2019

IPCC, 2012 – Field, C.B., V. Barros, T.F. Stocker, D. Qin, D.J. Dokken, K.L. Ebi, M.D. Mastrandrea, K.J. Mach, G.-K. Plattner, S.K. Allen, M. Tignor, and P.M. Midgley (Eds.) Available from Cambridge University Press, The Edinburgh Building, Shaftesbury Road, Cambridge CB2 8RU ENGLAND, 582 pp. 2012.

JOHNSON, Lawrence A.; WHITE, Pamela J.; GALLOWAY, Richard (Ed.). Soybeans: chemistry, production, processing, and utilization. Elsevier, 2015.

KEATING, Brian A. *et al.* Food wedges: framing the global food demand and supply challenge towards 2050. *Global Food Security*, v. 3, n. 3-4, p. 125-132, 2014.

KOMATSU, Setsuko *et al.* A comprehensive analysis of the soybean genes and proteins expressed under flooding stress using transcriptome and proteome techniques. *Journal of Proteome Research*, v. 8, n. 10, p. 4766-4778, 2009.

KOZOMARA, Ana; GRIFFITHS-JONES, Sam. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic acids research*, v. 42, n. D1, p. D68-D73, 2014.

KULCHESKI, Franceli R. *et al.* Identification of novel soybean microRNAs involved in abiotic and biotic stresses. *BMC genomics*, v. 12, n. 1, p. 307, 2011.

LI, Haiyan *et al.* Characterization of the stress associated microRNAs in *Glycine max* by deep sequencing. *BMC plant biology*, v. 11, n. 1, p. 170, 2011.

LIU, Peiqing *et al.* RAP2. 6L overexpression delays waterlogging induced premature senescence by increasing stomatal closure more than antioxidant enzyme activity. *Plant molecular biology*, v. 79, n. 6, p. 609-622, 2012.

LIU, Tengfei *et al.* Global investigation of the co-evolution of MIRNA genes and micro RNA targets during soybean domestication. *The Plant Journal*, v. 85, n. 3, p. 396-409, 2016.

LORETI, Elena; VAN VEEN, Hans; PERATA, Pierdomenico. Plant responses to flooding stress. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 33, p. 64-71, 2016.

LUTTER, Dominik *et al.* Intronic microRNAs support their host genes by mediating synergistic and antagonistic regulatory effects. *BMC genomics*, v. 11, n. 1, p. 224, 2010.

MARCHESAN, E. Desenvolvimento de tecnologias para cultivo de soja em terras baixas. RECoDAF-Revista Eletrônica Competências Digitais para Agricultura Familiar, Tupã, v2, n. 1, p. 4-19, jan/jun. 2016

MAPA; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio Brasil 2016/2017 a 2026/2027; 8ª edição, p.1-125, 2017.

MARONEY, Patricia A. *et al.* Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nature Structural and Molecular Biology*, v. 13, n. 12, p. 1102, 2006.

MENDES, N. D.; FREITAS, Ana T.; SAGOT, M.-F. Current tools for the identification of miRNA genes and their targets. *Nucleic acids research*, v. 37, n. 8, p. 2419-2433, 2009.

MEYERS, Blake C. *et al.* Criteria for annotation of plant MicroRNAs. *The Plant Cell*, v. 20, n. 12, p. 3186-3190, 2008.

MOLDOVAN, Dov *et al.* Hypoxia-responsive microRNAs and trans-acting small interfering RNAs in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*, v. 61, n. 1, p. 165-177, 2009.

NOTTROT, Stephanie; SIMARD, Martin J.; RICHTER, Joel D. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nature Structural and Molecular Biology*, v. 13, n. 12, p. 1108, 2006.

NOZAWA, Masafumi; MIURA, Sayaka; NEI, Masatoshi. Origins and evolution of microRNA genes in plant species. *Genome biology and evolution*, v. 4, n. 3, p. 230-239, 2012.

OKAMURA, Katsutomo *et al.* The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*, v. 130, n. 1, p. 89-100, 2007.

OLENA, Abigail F.; PATTON, James G. Genomic organization of microRNAs. *Journal of cellular physiology*, v. 222, n. 3, p. 540-545, 2010.

PALATNIK, Javier F. *et al.* Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*, v. 425, n. 6955, p. 257, 2003.

PAUL, Melanie Verena *et al.* Oxygen sensing via the ethylene response transcription factor RAP2.12 affects plant metabolism and performance under both normoxia and hypoxia. *Plant physiology*, v. 172, n. 1, p. 141-153, 2016.

PAYTON, P.; *et al.* Gene expression profiling in peanut using high density oligonucleotide microarrays. *BMC Genomics*, 10:265, 2009.

PETERSEN, Christian P. *et al.* Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Molecular cell*, v. 21, n. 4, p. 533-542, 2006.

PILLAI, Ramesh S. *et al.* Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*, v. 309, n. 5740, p. 1573-1576, 2005.

PINTO, L.F.S.; GOMES, A.S.; NETO, L.A.J.; PAULETTO, E.A. Solos cultivados com Arroz Irrigado na Região Subtropical: RS e SC. In: MAGALHÃES JR., A. M;

GOMES, A. da S.; SANTOS, A. B. (Ed.) Sistema de Cultivo de Arroz Irrigado no Brasil. Pelotas, RS: Embrapa Clima Temperado, p. 59-72, 2006.

PUCCIARIELLO, Chiara *et al.* Plant responses to flooding. *Frontiers in plant science*, v. 5, p. 226, 2014.

RIQUELME, A.; HINRICHSEN, P. Non-symbiotic hemoglobin and its relation with hypoxic stress. *Chilean Journal of Agricultural Research*, Santiago de Chile, v.75, n.1, p.80-89, 2015.

ROBERTS, J.K.M., Callis, J., Wemmer, D., Walbot, V. and Jardetzky, O. Mechanism of cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize root tips and its role in survival under hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81: 3379-3383, 1984.

SABLOK, Gaurav *et al.* isomiRs: increasing evidences of isomiRs complexity in plant stress functional biology. *Frontiers in plant science*, v. 6, p. 949, 2015.

SAIRAM, R. K. *et al.* Physiology and biochemistry of waterlogging tolerance in plants. *Biologia plantarum*, v. 52, n. 3, p. 401, 2008.

SCHLENKER, W. (2018). Introduction to " Understanding Productivity Growth in Agriculture". In *Understanding Productivity Growth in Agriculture*. University of Chicago Press.

SCHMUTZ, J. *et al.* Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*, 463:178-83, 2010

SHARMA, Parbodh C.; KUMAR, Arvind; VINEETH, T. V. Current Trends in Salinity and Waterlogging Tolerance. In: *Abiotic Stress Management for Resilient Agriculture*. Springer, Singapore, p. 177-220, 2017.

SOSBAI - Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil. Santa Maria: SOSBAI, 192 p. 2014.

SOSBAI - Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil. Cachoeirinha: SOSBAI, 200 p. 2016.

SOSBAI - Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil. Pelotas: SOSBAI, 205 p. 2018.

SOUZA, R.; CAMARGO, F.A.O; VAL, L.C. Solos alagados (reações de redox). In: Meurerer, E. J. (Ed.). *Fundamentos de Química do Solo* 6ª edição. Porto Alegre, Evangraf, p.177-200, 2015

STEFFENS, Bianka; RASMUSSEN, Amanda. The physiology of adventitious roots. *Plant Physiology*, v. 170, n. 2, p. 603-617, 2016.

STRIKER, Gustavo Gabriel. Flooding stress on plants: anatomical, morphological and physiological responses. In: Botany. InTech, 2012.

STRUBBERG, Ashlee M.; MADISON, Blair B. MicroRNAs in the etiology of colorectal cancer: Pathways and clinical implications. *Disease models & mechanisms*, v. 10, n. 3, p. 197-214, 2017.

SUBRAMANIAN, Senthil *et al.* Novel and nodulation-regulated microRNAs in soybean roots. *BMC genomics*, v. 9, n. 1, p. 160, 2008.

SYED, Naeem H. et al. Core clock, SUB1, and ABAR genes mediate flooding and drought responses via alternative splicing in soybean. *Journal of experimental botany*, v. 66, n. 22, p. 7129-7149, 2015.

TANG, Guiliang. Plant microRNAs: an insight into their gene structures and evolution. In: *Seminars in cell & developmental biology*. Academic Press, p. 782-789, 2010.

TIAN, Bin *et al.* Genome-wide identification of soybean microRNA responsive to soybean cyst nematodes infection by deep sequencing. *BMC genomics*, v. 18, n. 1, p. 572, 2017.

TURNER, Marie; YU, Oliver; SUBRAMANIAN, Senthil. Genome organization and characteristics of soybean microRNAs. *BMC genomics*, v. 13, n. 1, p. 169, 2012.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA. Long-Term agricultural projections agricultural.USDA Agricultural Projections to 2027. Long-Term Projections Process. Estados Unidos: USDA, 2018. Disponível em: <www.usda.gov/oce/commodity/projections>. Acesso em: 7 mar. 2018

VAN VEEN, Hans *et al.* Two *Rumex* species from contrasting hydrological niches regulate flooding tolerance through distinct mechanisms. *The Plant Cell*, p. tpc. 113.119016, 2013.

VASUDEVAN, Shobha; TONG, Yingchun; STEITZ, Joan A. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, v. 318, n. 5858, p. 1931-1934, 2007.

VENU, R. C.; SREEREKHA, M. V.; MADHAV, M. S.; NOBUTA, K.; MOHAN, K. M.; CHEN, S.;...WANG, G. L. Deep transcriptome sequencing reveals the expression of key functional and regulatory genes involved in the abiotic stress signaling pathways in rice. *Journal of Plant Biology*, 56(4):216-231, 2013.

VOESENEK, L. A. C. J.; BAILEY-SERRES, J. Flooding tolerance: O₂ sensing and survival strategies. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 16, n. 5, p. 647-653, 2013.

VOESENEK, Laurentius ACJ; BAILEY-SERRES, Julia. Flood adaptive traits and processes: an overview. *New Phytologist*, v. 206, n. 1, p. 57-73, 2015.

WONG, James *et al.* Roles of small RNA s in soybean defense against *P hytophthora sojae* infection. *The Plant Journal*, v. 79, n. 6, p. 928-940, 2014.

WU, Gang *et al.* The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell*, v. 138, n. 4, p. 750-759, 2009.

WU, Liang *et al.* DNA methylation mediated by a microRNA pathway. *Molecular cell*, v. 38, n. 3, p. 465-475, 2010.

YAMAUCHI, Takaki *et al.* Ethylene-dependent aerenchyma formation in adventitious roots is regulated differently in rice and maize. *Plant, cell & environment*, v. 39, n. 10, p. 2145-2157, 2016.

YAN, Zhe *et al.* Identification and functional characterization of soybean root hair micro RNA s expressed in response to *B radyrhizobium japonicum* infection. *Plant biotechnology journal*, v. 14, n. 1, p. 332-341, 2016.

YAN, Zhe *et al.* Identification of microRNAs and their mRNA targets during soybean nodule development: functional analysis of the role of miR393j-3p in soybean nodulation. *New Phytologist*, v. 207, n. 3, p. 748-759, 2015.

YANG, Xiaozeng; LI, Lei. miRDeep-P: a computational tool for analyzing the microRNA transcriptome in plants. *Bioinformatics*, v. 27, n. 18, p. 2614-2615, 2011.

ZENG, Qiao-Ying *et al.* Identification of wild soybean miRNAs and their target genes responsive to aluminum stress. *BMC plant biology*, v. 12, n. 1, p. 182, 2012.

ZHAI, Lihong *et al.* Genome-wide identification and analysis of microRNA responding to long-term waterlogging in crown roots of maize seedlings. *Physiologia plantarum*, v. 147, n. 2, p. 181-193, 2013.

ZHANG, YanFeng; ZHANG, Rui; SU, Bing. Diversity and evolution of MicroRNA gene clusters. *Science in China Series C: Life Sciences*, v. 52, n. 3, p. 261-266, 2009.

ZHANG, Yijun *et al.* A novel HIV-1-encoded microRNA enhances its viral replication by targeting the TATA box region. *Retrovirology*, v. 11, n. 1, p. 23, 2014.

ZHAO, Meixia *et al.* Evolutionary patterns and coevolutionary consequences of MIRNA genes and MicroRNA targets triggered by multiple mechanisms of genomic duplications in soybean. *The Plant Cell*, v. 27, n. 3, p. 546-562, 2015.

2. CAPÍTULO 2: Caracterização fisiológica e molecular de genótipos de soja sob alagamento

2.1. Resumo

O encharcamento do solo induz a hipóxia e promove, nas plantas, mudanças em uma complexa rede regulatória de fatores de transcrição e proteínas de sinalização, que quando ativadas ou reprimidas coordenam as adaptações celulares no metabolismo a esta condição ambiental. A duração do encharcamento é um fator importante na determinação da sobrevivência da planta, e está relacionada com a disponibilidade de oxigênio (O₂). Para se obter novos *insights* sobre os processos que culminam na tolerância à privação de oxigênio em soja, a expressão de genes potencialmente envolvidos no metabolismo de plantas sob condições hipóxicas foi avaliada em folhas e raízes de oito genótipos que apresentam diferentes níveis de tolerância ao encharcamento. As plantas foram submetidas a dois tratamentos de encharcamento do solo, por um período curto (3 dias) e um período longo (11 dias). Os resultados obtidos mostraram que a condição de encharcamento do solo resultou na rápida formação de raízes adventícias nos genótipos. Genes relacionados com os processos de fermentação, glicólise e relacionados à parede celular foram regulados em resposta a condição de encharcamento em todos os genótipos, porém com diferentes níveis de expressão. A hipóxia provocada pelo encharcamento do solo teve consequências não apenas para o metabolismo do carbono, mas também para o metabolismo do nitrogênio. Em síntese, os genótipos tolerantes apresentaram um mecanismo envolvendo prioritariamente a mudança de nível de expressão de genes envolvidos no ajuste metabólico regulando a mudança da respiração aeróbica para anaeróbica.

Palavras-chave: *Glycine max*, encharcamento, hipóxia, raízes adventícias, respiração anaeróbica

2.2. Introdução

A soja é a quarta principal safra em volume produzida globalmente, e a commodity agrícola mais negociada. Juntos, os grãos e seus derivados respondem por mais de 10% do valor total do comércio agrícola mundial (Lee *et al.*, 2016). Essa dimensão econômica é principalmente devido a composição do grão que é fonte de óleo e proteína vegetal com alto valor nutritivo; além de, macronutrientes, minerais e outros metabólitos secundários benéficos para a saúde, possibilitando sua ampla utilização na alimentação humana e animal, na produção de bicomcombustível, além de compor a formulação de vários produtos na indústria química (Deshmukh *et al.*, 2014; Johnson *et al.*, 2015).

Entretanto, o clima é um grande desafio para uma produção sustentável de culturas de grande extensões, tais como soja, trigo, milho e arroz que respondem por 75% das calorias consumidas pela humanidade, direta ou indiretamente por intermédio de animais que são alimentados com esses grãos (Schlenker, 2018). Estas culturas têm sua produtividade muito prejudicada devido as instabilidades climáticas que são responsáveis por um terço da variação da produção global (Ray *et al.*, 2015).

Entre as restrições ambientais impostas à produção agrícola uma das mais importante é o alagamento. Esta condição adversa ocorre em 10% da área terrestre global, e pode resultar em perdas de rendimento que variam entre 15% e 80% dependendo da espécie, do tipo de solo e da duração do estresse (Patel *et al.*, 2014). Em números, as inundações podem resultar em perdas anuais de mais de US\$ 80 bilhões (<http://floodobservatory.colorado.edu/>). Nos anos de 2010, 2011 e 2016, as perdas causadas por inundações excederam as causadas pela seca ou outros desastres naturais (Pedersen *et al.*, 2017). E as previsões climáticas indicam que nos próximos anos, estes problemas se intensificarão, devido a alterações no regime de chuvas que ocorrerão muito provavelmente em decorrência das mudanças climáticas (Hirabayashi *et al.*, 2013).

Além disso, algumas áreas estão sujeitas à condições de alagamento ou encharcamento devido a característica do solo que impede a drenagem (hidromorfismo), e onde o cultivo fica restrito culturas adaptadas a essa condição como o arroz, porém a monocultura promove o aumento da incidência de ervas daninhas, especificamente o arroz vermelho, pragas e doenças. Uma alternativa empregada que tem apresentado grande potencial técnico e econômico para proporcionar maior sustentabilidade a este ambiente de produção é o cultivo de soja, entretanto é necessário o uso de cultivares

adaptadas a essa condição e um manejo adequado do solo (Vedalgo et al., 2012; Thomas, Lange, 2014).

De modo geral, a substituição do ar pela água nos poros de solos alagados promove uma série de alterações físicas, químicas e biológicas que alteram a capacidade do solo de suportar o crescimento das plantas (Souza et al., 2015). Como resultado da deficiência de oxigênio e conseqüente alterações que ocorrem no solo, são induzidas nas plantas várias modificações bioquímicas e anatômicas no sistema radicular, mas a principal mudança ocorre no metabolismo de carboidratos das plantas, que se desloca para a fermentação etanólica e de lactato para fornecer o ATP suficiente para a sobrevivência celular (Patel et al., 2014). Essas modificações são decorrentes da ativação de uma série de genes de resposta à deficiência de oxigênio. Estes genes foram classificados em três categorias que compreendem os genes sensíveis à detecção de oxigênio e envolvidos na sinalização celular; os genes de ajuste metabólico e os genes que mantêm os microambientes internos da planta (Sharma et al, 2017).

Os genes sensíveis ao oxigênio e sinalização celular induzem a síntese da enzima oxidase alternativa (AOX) para ativar uma rota alternativa para a passagem de elétrons na cadeia respiratória, reduzindo a geração de ATP. Também, esses genes estimulam a proteína ativadora Rop GTPase relacionada as espécies reativas de oxigênio (ROS). E ainda, alguns genes podem codificar proteínas importantes envolvidas na sinalização de Ca^{2+} , como calmodulina e CAP (peptídeo associado à calmodulina) (Sharma et al, 2017).

Os genes de ajuste metabólico regulam a mudança da respiração aeróbica para a fermentação anaeróbia, aumentando as proteínas anaeróbicas (ANPs). Nesse caso, genes como piruvato descarboxilase (PDC), álcool desidrogenase (ADH) e lactato desidrogenase (LDH), que são necessários para o metabolismo anaeróbico são estimulados, enquanto a expressão de genes relacionados ao metabolismo aeróbico é reprimida (Sharma et al, 2017).

Os genes que mantêm os microambientes internos de plantas ativam a glutamato descarboxilase (GAD), enzima que catalisa a descarboxilação do glutamato para o ácido gama-aminobutírico (GABA) e CO_2 , que interage com a calmodulina, levando à regulação do pH (Sharma et al, 2017).

O padrão de resposta das plantas ao excesso de água no solo é determinado pela duração e intensidade do estresse, mas também pela fase de desenvolvimento no momento da imposição do estresse e pelo genótipo da planta (Colmer; Voisenek, 2009).

Diferentes espécies, ou mesmo diferentes genótipos da mesma espécie, podem adotar estratégias específicas de acordo com a intensidade e duração da condição hipóxica. Essas estratégias são classificadas em evasão, escape e quiescência (Colmer; Voisenek, 2009; Loreti et al., 2016).

Em períodos curto de alagamento ou encharcamento, como um ou dois dias, as mudanças metabólicas produzem enzimas da via glicolítica e fermentativa, conhecidas como proteínas de estresse anaeróbico, que ajudam as plantas a tolerar a hipóxia nas raízes (Sairam et al., 2008; Irfan et al., 2010). Quando ocorrem períodos mais longos de hipóxia, as alterações em nível metabólico resultam em alterações morfológicas no sistema radicular, como o desenvolvimento de aerênquima, raízes adventícias e hipertrofia do caule das plantas (Striker, 2012). Também pode ocorrer a morte da raiz principal e o aumento da quantidade de raízes laterais com drástica queda no volume total de raízes (Striker, 2012).

Neste contexto, considerando a importância da cultura da soja, as restrições a produção agrícola provocadas por áreas de solos hidromórficos, e as previsões climáticas para as próximas décadas que indicam alterações no regime de chuvas; pesquisas básicas e direcionadas ao entendimento mais detalhado das respostas agronômicas, fisiológicas e moleculares de plantas de soja ao encharcamento são fundamentais para o desenvolvimento de plantas mais tolerantes que contribuam para a sustentabilidade da agricultura mundial e segurança alimentar de uma população crescente. Assim o objetivo deste trabalho foi caracterizar oito genótipos convencionais de soja, incluindo linhas e cultivares comerciais, para as respostas agronômicas, fisiológicas e para a expressão de genes-chaves em resposta à condição de hipóxia. Com estes dados espera-se obter novos *insights* sobre os processos biológicos ativados ou reprimidos em soja que culminam na tolerância à privação de oxigênio. Estas informações podem auxiliar no delineamento de estratégias para o desenvolvimento de cultivares que tolerem períodos de hipóxia, sem perdas significativas de produção.

2.3. Material e Métodos

2.3.1. Obtenção do material biológico

Oito genótipos de soja (*Glycine max*), incluindo linhas e cultivares comerciais, com diferentes níveis de tolerância ao encharcamento (Tabela 1) foram avaliadas em 2 tempos de tratamento, o primeiro sendo 3 dias de indução do encharcamento

considerado um curto período (SF), e o segundo, 11 dias de tratamento, considerado um longo período (LF). O delineamento experimental foi em blocos casualizados, composto por oito genótipos de soja x 02 condições de irrigação (controle e encharcamento) x 02 tempos de tratamento (3 dias e 11 dias), constituindo três blocos com triplicatas biológicas. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, sob temperatura de $30 \pm 4^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $68 \pm 8\%$.

Tabela 1 Relação dos genótipos de soja e caracterização em relação a resposta a condição de encharcamento.

Genótipo	Caracterização	Referência
Embrapa 45	Tolerante	Nakayama et al., 2017
BRS 213	Tolerante	Fantes et al., 2010
BMX Valente RR	Tolerante	
PEL BR10 6049 RR	Tolerante	
PEL BR11 6000 RR	Sensível	
BRS 211	Sensível	Ludwig et al., 2016
BR 4	Sensível	Nakayama et al., 2017
BRS Macota	Sensível	Ludwig et al., 2016

Sementes dos oito genótipos de soja foram germinadas em papel Germitest[®] por 96h a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e 100% de umidade relativa (UR). Posteriormente, as plântulas foram imersas em inoculante microbiano Atmo[®] (*Bradyrhizobium japonicum* $5,0 \times 10^8$ UFC mL^{-1}) por 1 min e transferidas individualmente para vasos de 1L previamente preenchidos com 1kg de uma mistura substrato:areia (2:1). Cada vaso comportou uma única plântula e todos foram irrigados diariamente com volume de água para manter próximo a capacidade de campo. Quando as plantas atingiram o estágio de desenvolvimento V₄ na escala fenológica a simulação da condição de encharcamento foi imposta, pela colocação dos vasos de 1L dentro de vasos maiores de 3L cheios de água. As plantas foram mantidas nessa condição durante os períodos de tratamento curto e longo. No grupo de plantas controle, a irrigação diária foi mantida com volume de água suficiente para manter próximo a capacidade de campo.

Folhas e raízes de todas as plantas sob condição controle e de encharcamento foram coletadas para cada tratamento. No tratamento de SF as plantas encontravam-se no estágio de desenvolvimento fenológico V₅, e no tratamento de LF as plantas estavam em estágio de desenvolvimento fenológico R₁. O material biológico coletado foi imediatamente congelado em N₂ líquido e estocado à -80°C até o momento da extração do RNA.

2.3.2. Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído das amostras de raízes e folhas dos oito genótipos de soja utilizando o reagente Trizol[®] com modificações. Assim, foram realizadas duas etapas de precipitação do RNA, na primeira foram adicionados 250µL de uma solução altamente salina (0,8M de Citrato de Sódio e 1,2M NaCl) e 250µL de álcool Isopropanol ao sobrenadante obtido na fase de separação com clorofórmio e; uma segunda precipitação adicional após a ressuspensão do RNA em volume de 100µL onde foram adicionados 10µL de Acetato de Sódio 3M e 250µL de etanol. A quantificação do RNA foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop[™] 1000 (Thermo Fisher Scientific), considerando os parâmetros de qualidade e pureza de razão 260/280 entre 1,8-2 e razão 260/230 $\geq 2,0$. A integridade do RNA foi avaliada via eletroforese em gel de Agarose 1%, sendo que apenas amostras que apresentaram bandas íntegras referentes ao RNA ribossômico foram consideradas.

O RNA obtido foi tratado com DNaseI Amplification Grade, (Invitrogen Life Technologies) e a seguir foi realizada uma PCR convencional para confirmação da ausência de gDNA. O cDNA foi sintetizado utilizando o kit Superscript[®] III First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies). Os procedimentos de tratamento com DNase e síntese de cDNA foram realizados seguindo as orientações do fabricante.

2.3.3. Expressão gênica via RTqPCR

Genes importantes nas respostas moleculares das plantas à condição de hipóxia foram escolhidos com base na literatura disponível e descritos em resultados de estudos prévios. A expressão destes genes-alvo foi avaliada nos oito genótipos de soja sob as condições controle e tratamentos de encharcamento (curto e longo). A eficiência de amplificação desses genes alvos e dos genes normalizadores foi realizada utilizando-se uma diluição seriada de um “bulk” das amostras de cDNA em estudo (Tabela 2).

Tabela 2 Identificação dos genes-alvo escolhidos relacionados as respostas vegetais a condição de hipóxia, sequências dos *primers* F e R, Glyma correspondente, eficiência de amplificação e descrição da função biológica.

Identificação	Sequencia	Glymas	Eficiência (%)	Descrição
ADH-F	CCTGTGAGGGACTGAGTTCTCTTC	Glyma.04G240800.1 / Glyma.06G122600	90	Álcool desidrogenase 1
ADH-R	ACAGCAGCAAAGGTCCTATCATTCT			
SUSY-F	TGTTGTTGCATGATTTGGATCTTG	Glyma.13G114000	99,9	Sintase da sacarose 4
SUSY-R	CACGGCTTAAATGAATTGATGG			
NR-F	AATCCCATGCAAGCTCATCTCC	Glyma.06G109200	84,9	Nitrato redutase 1
NR-R	CAAACCCATGAGTAGGTCGTCG			
nsHB-F	TGAAACCACCCTCCTCTTAGACTCC	Glyma.11G121800	88,5	Hemoglobina não-simbionte 1
nsHB-R	GAATGCGAAACACTTCCCAACC			
AOX-F	CTTCTGGGGTATTTGTTGCACCT	Glyma.04G123800	91,5	Oxidase alternativa 1a
AOX-R	ATTGCCCTTGTCCAGCTCCTTA			
APX-F	CACGGTGCCCATATAATTTCTCTC	Glyma.12G073100	91,7	Ascorbato peroxidase 1
APX-R	CAACCCAACTCCAATCATCATCAC			
P4H-F	GAATAGTGTGCATGGAGGATGTGAG	Glyma.10G297300	91,3	Prolina-4-hidroxilase 1
P4H-R	TCTTGAGTCACACCGCACAAAGAT			
TPS-F	TGCGTAACAGCAATCTTTCAACAA	Glyma.17G067800	97,5	Trealose-6-fosfato sintase 11
TPS-R	CCCAAGACCTAATCCACCAACC			
GmSRK2-F	CATGTTGGTTGGTGCATATC	Glyma.02G135500	90,5	quinase GmSRK2
GmSRK2-R	CTTGATATCAGATGACGGCA			
GOGAT-F	GTAGGGAACACTTGCTTGTA	Glyma.03G128300	92	glutamate synthetase (GOGAT)
GOGAT-R	ACCAGTCATGTAACAAC			
GmAlaAT-1F	AGTTGCAGAAATGTGGTTTG	Glyma.01G026700	90,3	alanina aminotransferase GmAlaAT
GmAlaAT-1R	AGGCAGTAGAAAACATCTGG			
GmAlaAT-2F	AGAATATTTGGCGTCCCTT	Glyma.07G045900	90,5	
GmAlaAT-2R	TTTGATAGCCTTTTCGGACA			
Cab21-F	ATCTACAATGGCTGCTTCAA	Glyma.16G165800	90,5	SAG - Chlorophyll a/b binding protein - Cab21
Cab21-R	GCTGTTTTCTCATGCTAAC			
GmGAPDH-F	GTGGAGACCCATTGGAGGAA	Glyma.06G015900	93,4	phosphate dehydrogenase B subunit
GmGAPDH-R	TGGTTTGTGCTGGTAATGGTA			
Gamav-F	GAGTGTATGGACTGTACTCTCTGCT	Glyma.04G049900	87,8	GAMMAVPE gamma vacuolar processing enzyme
Gamav-R	TCCCCAGCGTCCCATTTG			
Gm β -Actina -F	GAGCTATGAATTGCCGTGATGG	Glyma.15G050200	93	Actin
Gm β -Actina -R	CGTTTCATGAATTCCAGTAGC			
FYVE-F	TTCTGTCTTCTGCAAGTGGTG	Glyma.13G114700	98,4	FYVE zinc finger
FYVE-R	GATCCCTCATCCATACATTTTCAG			

As reações de PCR quantitativo foram conduzidas em equipamento 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando o kit GoTaq[®] qPCR and RT-qPCR Systems (Promega Corporation) conforme as instruções do fabricante. A condição de amplificação foi composta por um período inicial de 95°C por 2 min, seguido por 40 ciclos composto de 95°C por 15s, 60°C por 1 min. A curva de dissociação foi obtida com um ciclo composto de 95°C por 15s, 60°C por 15s e por fim um período de 95°C por 15s.

A expressão relativa foi determinada pela normalização com a média dos ciclos de quantificação (Ct) dos genes de referência *Elongation Factor 1B* (ELF1B) e β -actina, previamente identificados como mais estáveis para condição de encharcamento em soja (Nakayama et al., 2014). A expressão dos genes alvos nos genótipos de soja foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak; Schmittgen, 2001). Foi considerada como amostra calibradora para cálculo de $\Delta\Delta Ct$ a amostra na condição controle referente a cada genótipo, tecido e período de tratamento.

2.3.4. Medidas de Parâmetros fisiológicos

Para avaliar o efeito da condição de encharcamento sobre as respostas fisiológicas das plantas de soja, foram realizadas no momento da coleta do material biológico, medidas de parâmetros fisiológicos tais como trocas gasosas [taxa fotossintética (A), concentração intercelular de CO₂ (C_i), condutância estomática (gs)] e de temperatura foliar. A leitura destes dados foi realizada utilizando-se um analisador portátil de fotossíntese IRGA LI-6400XT (LICOR) e padronizada no folíolo central do terceiro trifólio completamente expandido sentido ápice-base. Neste mesmo trifólio foi realizada a leitura utilizando medidor de clorofila portátil SPAD 502 que executa a medição de absorvância da folha nas regiões do vermelho e do infra-vermelho próximo e calcula o valor SPAD proporcional à quantidade de clorofila presente na folha.

2.3.5. Análise de parâmetros agronômicos

Após a obtenção dos dados relativos aos parâmetros fisiológicos e da coleta do material para análise de expressão gênica, as plantas submetidas ao tratamento de longo período de encharcamento (LF) foram transferidas para vasos de 8L contendo substrato constituído de terra:areia:composto orgânico (3:2:2) e mantidas sob irrigação automática até o final do ciclo, quando alguns parâmetros agronômicos foram amostrados. Desta forma, ao final do ciclo, as seguintes variáveis foram avaliadas: número de vagens com sementes (NVCS), número de vagens sem sementes (NVSS), massa seca total de sementes (MSTS), número total de sementes (NTS), número de sementes por vagem (NSV) e peso de cem sementes (P100).

2.4. Resultados e Discussão

2.4.1. Parâmetros Fisiológicos

Todos os parâmetros fisiológicos avaliados [Taxa fotossintética (A), Condutância estomática (gs), Concentração intracelular de CO₂, (Ci), Transpiração (Tr), Temperatura Foliar (T^{of}) e Teor de clorofila (Clor)] se correlacionaram tanto em 3 dias de encharcamento considerado como curto período (SF) quanto em 11 dias de encharcamento considerado como longo período (LF) (Figura 1). A temperatura foliar apresentou uma forte correlação negativa com todos os parâmetros avaliados, enquanto os demais parâmetros se correlacionaram positivamente (Figura 1).

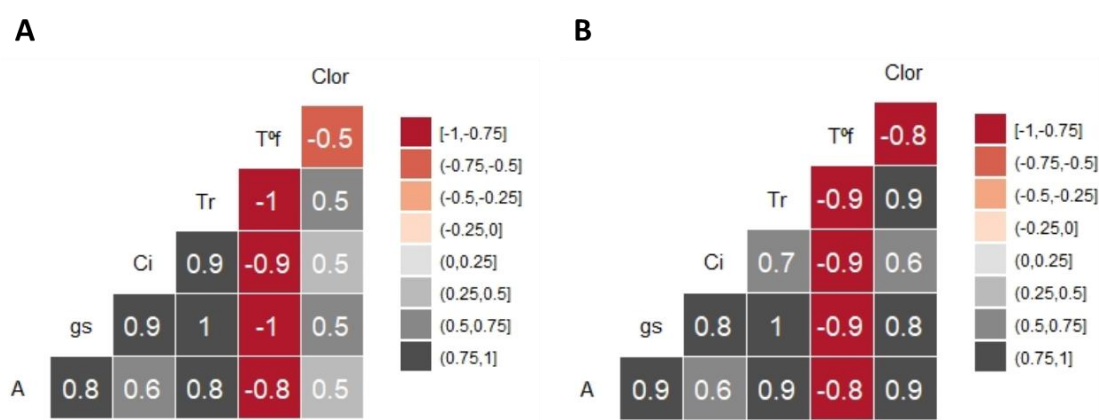


Figura 1 Correlação entre os parâmetros fisiológicos Taxa fotossintética (A), Condutância estomática (gs), Concentração intracelular de CO₂, (Ci), Transpiração (Tr), Temperatura Foliar (T^{of}) e Teor de clorofila (Clor) avaliados em genótipos de soja submetidos a condição de encharcamento. A) curto período de encharcamento, 3 dias (SF) e B) longo período de encharcamento, 11 dias (LF). Quadros vermelho indicam correlação negativa e quadros cinza indicam correlação positiva. O grau de saturação da cor dos quadros indica a força da correlação entre os parâmetros.

Uma das primeiras respostas ao encharcamento do solo é inibição da abertura dos estômatos que promove a redução na condutância estomática (gs), e como resultado a redução da fotossíntese (A). Foi possível observar uma forte correlação positiva entre esses parâmetros (Figura 1), onde em todos os genótipos de soja estudados após 3 dias de encharcamento (SF) houve redução tanto de gs quanto de A (Figura 2A e 2B). Após 11 dias de encharcamento (LF) a fotossíntese foi ainda menor que a observada no tratamento SF, porém não ocorreu o mesmo com gs que não diferiu significativamente do observado em SF (Figura 2A e 2B), demonstrando que além da redução da gs, outros fatores como a diminuição do conteúdo de clorofila nas folhas (Figura 2F), que ocorreu posteriormente também podem ter contribuído para a inibição da fotossíntese, hipótese

corroborada pelo aumento da correlação entre a fotossíntese e o teor de clorofila observado no tratamento de longo período de encharcamento (Figura 1B).

De modo geral, a condição de encharcamento promoveu redução acentuada da condutância estomática, fotossíntese e transpiração (Figura 2A, 2B e 2D), redução moderada de C_i e teor de clorofila (Figura 2C e 2F) e aumento da temperatura foliar (Figura 2E). Estas respostas são esperadas para plantas submetidas a condição de encharcamento, onde ocorre o declínio do pH citosólico e a diminuição do transporte de água e da condutividade hidráulica das raízes resultando no fechamento estomático e assim na redução do g_s com a finalidade de manter o potencial hídrico da folha (Tournaire-Roux et al., 2003). A transpiração também é afetada pela condição anaeróbica gerada pelo encharcamento, que quando é prolongada resulta na morte da raiz devido ao fornecimento inadequado de oxigênio. Isto é seguido pela perda de clorofila das folhas inferiores, interrupção do crescimento das plantas e proliferação do crescimento de raízes adventícias (Steffens; Rasmussen, 2016), resposta anato-morfológica inicialmente observada no genótipos de soja considerados sensíveis ao encharcamento (Figura 3).

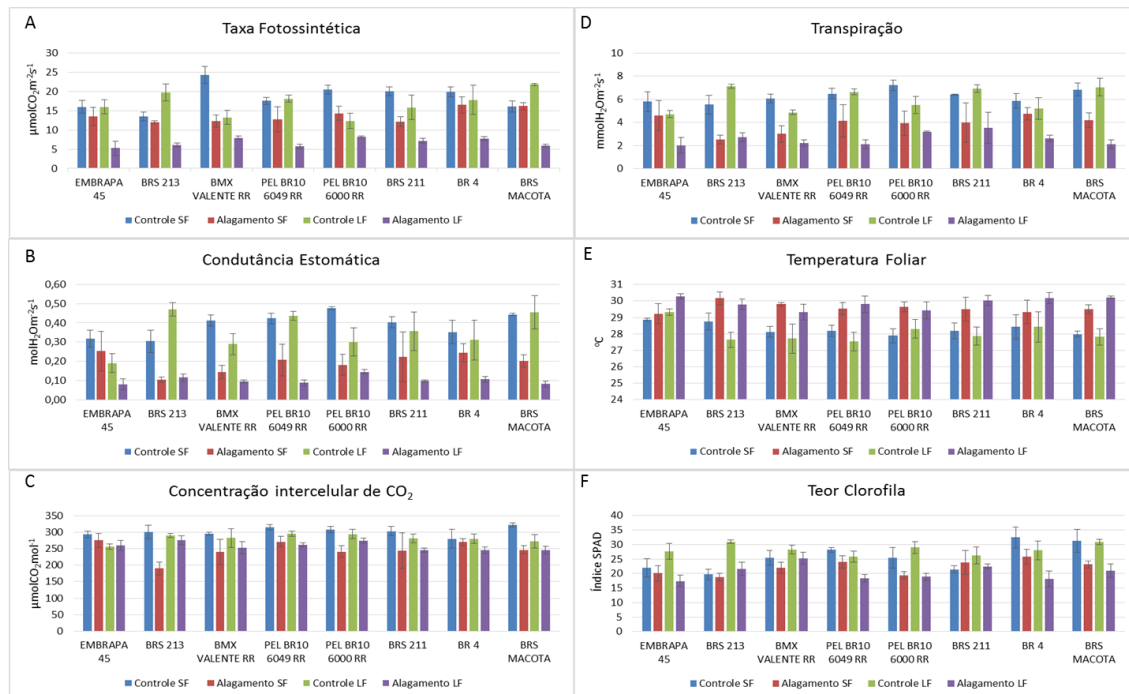


Figura 2 Parâmetros fisiológicos A) Taxa fotossintética, B) Condutância estomática, C) Concentração intracelular de CO_2 , D) Transpiração, E) Temperatura Foliar e F) Teor de clorofila avaliados em genótipos de soja na condição controle e submetidos a condição de curto período de encharcamento, 3 dias (SF) e longo período de encharcamento, 11 dias (LF).

Associado as respostas fisiológicas, também foi observada a redução das raízes principais e formação de raízes adventícias primeiramente nos genótipos considerados sensíveis ao encharcamento, e essas respostas ocorreram em todos os genótipos com o prolongamento do tempo de exposição (Figura 3A).

As modificações morfológicas observadas de formação de raízes adventícias nos primeiros dias de encharcamento nos genótipos considerados sensíveis ao encharcamento evidenciam a variação natural entre os genótipos para a tolerância ao encharcamento e demonstram que as raízes adventícias constituem uma adaptação da soja ao encharcamento. As raízes adventícias potencialmente substituem as raízes principais que são deterioradas como maneira de fornecer energia para o desenvolvimento de um sistema radicular melhor adaptado para manter o fornecimento de água e sais minerais em condição de hipóxia (Steffens; Rasmussen, 2016). Vários estudos têm relatado a importância das raízes adventícias e aerênquimas para facilitar o transporte de oxigênio para os tecidos hipóxicos (Thomas et al., 2005; Shimamura et al., 2010; Vidoz et al., 2010; Zhang et al., 2017), e as alterações morfológicas ou qualitativas das raízes foram relacionadas com as respostas de condutividade hidráulica e utilizadas para classificar genótipos de soja quanto a tolerância ao encharcamento (Jitsuyama, 2017).



Figura 3 Desenvolvimento radicular das cultivares de soja BRS Macota e BR 14, consideradas, respectivamente tolerante e sensível ao encharcamento nas condições controle e encharcamento. Em A) raízes de plantas submetidas ao um curto período de encharcamento, 3 dias (SF) e em B) raízes de plantas submetidas ao um longo período de encharcamento, 11 dias (LF).

2.4.2. Parâmetros Agronômicos

Um fator essencial para a avaliação da tolerância da soja ao encharcamento é o rendimento e a produção de sementes de qualidade nestas condições. Em nosso estudo, o encharcamento afetou o rendimento principalmente reduzindo o número de vagens por planta nos genótipos sensíveis ao encharcamento. Essa diminuição no rendimento pode ser atribuída à redução da fotossíntese, importante componente para a produção e estresse de nitrogênio. Resposta similar foi relatada em experimentos realizados em campo com diferentes genótipos de soja, nos quais se destacam ainda, que os efeitos do encharcamento sobre o rendimento são mais acentuados quando esta condição ocorre no estágio reprodutivo (Sullivan et al., 2001; Cho; Yamakawa, 2006; Rhine et al., 2010; Wu et al., 2017).

Tabela 3 Resultados dos parâmetros agronômicos avaliados nos genótipos de soja na condição controle e submetidos a 11 dias de encharcamento.

Genótipo	NVCS		NVSS		NVPP	
	Controle	Encharcamento	Controle	Encharcamento	Controle	Encharcamento
EMBRAPA 45	52,8 ± 7,5	54,5 ± 4	4,5 ± 1,2	8,3 ± 5,5	57 ± 7,3	62,8 ± 5,3
BRS 213	48,8 ± 5,6	35,5 ± 7,8	0	3,8 ± 2,5	48,8 ± 5,6	39,3 ± 9,9
BMX VALENTE RR	85,8 ± 14,5	83,5 ± 14,3	2,5 ± 1,2	1 ± 0,7	88,4 ± 14	84,5 ± 14,9
PEL BR10 6049 RR	98,5 ± 7,9	75 ± 4,2	9,8 ± 5,5	6,8 ± 3,4	108 ± 7,2	81,8 ± 7,1
PEL BR10 6000 RR	87,3 ± 7,4	62,3 ± 11,4	4,3 ± 3,3	0,8 ± 0,5	91,5 ± 5,7	63 ± 11,3
BRS 211	42,3 ± 7,5	21,3 ± 1,9	0,8 ± 0,5	3 ± 1,2	43 ± 7,3	24,3 ± 2,1
BR 4	102,5 ± 6,5	33,3 ± 5,5	1,3 ± 0,5	0	103,8 ± 6,4	33,3 ± 5,5
BRS MACOTA	116,8 ± 28,2	75,3 ± 22,5	30,3 ± 16,3	3,3 ± 2,3	147 ± 22,5	73,5 ± 20,5

Genótipo	NTS		P100		MSTS	
	Controle	Encharcamento	Controle	Encharcamento	Controle	Encharcamento
EMBRAPA 45	110,3 ± 10,1	130,8 ± 7,1	21,1 ± 0,3	16,9 ± 0,1	17,6 ± 0,1	14,4 ± 0,1
BRS 213	119,8 ± 15,1	91,8 ± 20,4	20 ± 0,1	17,4 ± 0,3	18,7 ± 0,1	16,5 ± 0,1
BMX VALENTE RR	194,8 ± 32,2	193,8 ± 33,8	17,5 ± 0,1	16,2 ± 0,2	16,6 ± 0,1	14,3 ± 0,2
PEL BR10 6049 RR	194,8 ± 22	151 ± 7,9	16,5 ± 0,2	14,3 ± 0,1	14 ± 0,1	13,3 ± 0,1
PEL BR10 6000 RR	221,3 ± 19,7	154 ± 31,4	14,4 ± 0,1	16,2 ± 0,1	11,6 ± 0,1	13,8 ± 0,2
BRS 211	100,5 ± 17,3	55,8 ± 5,3	28,1 ± 0,1	19 ± 0,2	18 ± 0,1	16,7 ± 0,1
BR 4	201,3 ± 13,7	69,5 ± 11,6	16,5 ± 0,1	17,4 ± 0,2	15,1 ± 0,1	15,2 ± 0,1
BRS MACOTA	253,5 ± 64,1	161 ± 49,1	16,9 ± 0,2	15 ± 0,2	13,4 ± 0,1	14,9 ± 0,1

NVCS = número de vagens com sementes; NVSS = número de vagens sem sementes; NVPP = número de vagens por planta; NTS = número total de sementes; P100 = peso de 100 sementes; MSTS massa seca 100 sementes. As médias (n = 9) ± erro padrão.

2.4.3. Respostas Moleculares

A expressão relativa de genes envolvidos em diferentes mecanismos de respostas das plantas à condição de encharcamento foi quantificada. Estes genes estão relacionados à processos tais como fermentação, catabolismo de sacarose, metabolismo de carbono e nitrogênio, prevenção e detoxicação de ROS (*Reactive Oxygen Species*) e mecanismos de sinalização (Tabela 2).

Mudanças na expressão de genes relacionados ao ajuste metabólico, envolvendo o metabolismo do carbono foram evidentes no tecido radicular, uma vez que genes associados à glicólise e a fermentação foram induzidos pelo encharcamento. O gene da ADH, envolvida no processo metabólico de fermentação, de modo geral, foi *up* regulado tanto em folhas quanto em raízes para todos os genótipos de soja avaliados, sendo mais expresso nas raízes no SF. Nas folhas, este gene não apresentou variação significativa entre os tratamentos de SF e LF, com exceção da cultivar BR4 (sensível) onde a expressão foi *down* regulada no LF (Figura 4A).

Em soja, foi relatado que os genes codificadores das enzimas que atuam na rota de fermentação alcoólica como a piruvato descarboxilase (PDC), álcool desidrogenase (ADH), assim como o gene codificador da enzima lactato desidrogenase (LDH), que atua na fermentação láctica, têm suas expressões aumentadas em plantas submetidas a condição de encharcamento e estão associados à capacidade de resposta de plantas de soja ao encharcamento do solo (Komatsu et al., 2009).

Em raízes dos genótipos de soja Fundacep 53 RR e BRS Macota foi relatado que a atividade de ADH, piruvato descarboxilase e lactato desidrogenase, assim como o conteúdo de etanol e lactato, aumentaram com hipóxia (Borela et al., 2014). Ainda em soja após 12 h de inundação, a ADH teve sua expressão aumentada em mais de 10.000 vezes em relação ao controle, demonstrando a atuação de ADH em condições de curto período de encharcamento e sugerido que a resposta precoce deste gene poderia ser uma importante adaptação para garantir a sobrevivência sob hipóxia (Komatsu et al., 2009). Ainda a super expressão do gene GmAdh2 em linhagens de soja transgênicas induziu mudanças na glicólise e fermentação alcoólica e melhorou a germinação da soja transgênica sob condição de encharcamento (Tougou et al. 2012).

O gene da sacarose sintase 4 (SUSY) participante do catabolismo da sacarose, foi *up* regulado nas raízes em SF nos genótipos tolerantes, porém nos genótipos suscetíveis, o perfil de expressão variou apresentando tendência de redução da

expressão com o aumento do tempo de exposição ao encharcamento (Figura 4B). Esse perfil também foi observado em raízes de guandu (*Cajanus cajan* (L.)), onde foi observado o aumento na expressão e atividade de Susy e ADH em genótipos tolerantes e diminuição nos genótipos sensíveis (Kumutha et al., 2008). Efeitos semelhantes também foram relatados em raízes de feijão sob hipóxia (Sairam et al., 2009). Portanto, sugere-se que o aumento da expressão de Susy e ADH nas raízes dos genótipos pode contribuir para maior tolerância aos efeitos da hipóxia, através do fornecimento de açúcares redutores para atividade glicolítica e reciclagem de NADH para a continuação da glicólise, que constitui a principal fonte de energia sob hipóxia. Em folhas, em geral, o gene SUSY foi *down* regulado nos genótipos tolerantes e *up* regulado nos genótipos sensíveis no SF com tendência de inversão do perfil de expressão no tratamento LF (Figura 4B).

No metabolismo do nitrogênio, a Nitrato redutase (NR), a glutamina (GS), a glutamato sintase (GOGAT) e a glutamato desidrogenase (GDH) são enzimas chave. O gene da nitrato redutase (NR) foi *up* regulado nas raízes em SF e LF, em geral com maior expressão em SF com exceção da cultivar BRS Macota (sensível) que apresentou maior expressão em LF. Nas folhas, esse gene foi *down* regulado (Figura 4C). A enzima NR catalisa a partir do nitrito a produção de óxido nítrico (NO) que constitui uma molécula sinalizadora endógena (Yamasaki; Sakihama, 2000). Em raízes de tomate a atividade da NR também apresentou aumento, de forma dependente do tempo de exposição, sob condições anóxicas, com a liberação concomitante de nitrito no meio de cultura. Esta enzima também exerce outras funções celulares permitindo a regeneração do NAD^+ e impedindo a queda do pH para níveis potencialmente letais (Allègre et al., 2004). A redução da atividade de NR em folhas de plantas em condição de encharcamento ocorre devido a rápida depleção de NO_3^- e O_2 sob condições anaeróbicas que leva à geração de NH_4^+ (Hoff et al., 1992). Em um experimento de campo com híbridos de milho em condição de encharcamento foi constatado a redução de N e da atividade das enzimas NR, GS e GOGAT (Ren et al., 2017).

O gene da glutamato sintetase GOGAT foi *down* regulado em SF nas raízes dos genótipos tolerantes com exceção de BRS213; e *up* regulado nos genótipos sensíveis com exceção de BRS Macota. No tratamento LF, este gene foi *down* regulado em todos os genótipos. Em folhas a tendência foi de *up*-regulação em SF e *down*-regulação em LF (Figura 4D). A GOGAT é uma enzima que produz glutamato a partir de glutamina e α -cetoglutarato e, juntamente com a glutamina sintetase (GS) desempenha um papel

central na regulação da assimilação de nitrogênio. No entanto, essa via metabólica pode ser alterada pelo ácido γ -aminobutírico (GABA) como observado em tabaco sob condição de alagamento (Zhang et al., 2016), e em seringueira ('*Hevea brasiliensis*') onde os resultados mostraram que sob hipoxia, plantas tratadas com nitrato apresentaram maior atividade de NR em relação ao controle. As atividades de GS, GOGAT e glutamato desidrogenase (GDH) foram significativamente reduzidas nas plantas submetidas ao alagamento independentemente da fonte de nitrogênio (de Carvalho et al., 2015). O perfil de regulação de GOGAT encontrado em soja sugere que nos genótipos sensíveis ao encharcamento possa ocorrer o desvio da via metabólica de nitrogênio de GS/GOGAT para GABA.

O gene de hemoglobina não simbiote (nsHB) foi *up* regulado nas raízes em todos os genótipos no SF, apresentando aumento da expressão em LF com exceção do genótipo Embrapa 45, no qual a expressão de nsHB foi *down* regulada em LF. Em folhas, este gene foi *down* regulado em ambos os tratamentos SF e LF com exceção do genótipo Embrapa 45, que novamente, mostrou perfil contrários ao demais genótipos, apresentando expressão *up* regulada nos dois tempos de tratamento (Figura 4E). A hemoglobina não-simbiótica (nsHb) mantém o estado energético da célula independente da fosforilação oxidativa mitocondrial e juntamente com o óxido nítrico (NO) têm sido sugeridos como uma alternativa à fermentação para manter um menor potencial redox, além de sua expressão ter sido associada também com a manutenção e crescimento radicular (Lekshmy et al., 2015).

Os genes da oxidase alternativa 1A (AOX) e ascorbato peroxidase (APX2), envolvidos na prevenção e detoxicação de ROS, apresentaram perfis de expressão opostos nas raízes nos dois períodos de encharcamento, enquanto AOX foi *up* regulado nas raízes para todos os genótipos e tempos, apresentando em geral maior expressão no LF; APX2 foi *down* regulado nos dois tempos. Enquanto que nas folhas o perfil de expressão foi similar, a expressão de AOX foi *up* regulada em quase todos os genótipos e tempos de encharcamento, apenas para os genótipos BR4 e BRS Macota (sensível) a expressão foi *down* regulada. A expressão de APX2 também foi *up* regulada, com exceção do genótipo PEL-BR10-6000RR, no qual o gene foi *down* regulado no SF (Figura 4F e 5A). Esses resultados indicam que além da resposta geral à privação de oxigênio, que consiste na reconfiguração do metabolismo central de carbono, os genótipos de soja também aumentaram seu sistema de defesa antioxidante.

A enzima AOX tem sido considerada como um caminho essencial da cadeia de transporte de elétrons e manutenção do desempenho fotossintético e síntese de clorofila para manter uma homeostase geral e aumentar a vida útil da planta durante o estresse hídrico (Vanlerberghe et al., 2016). Assim, AOX tem importante papel na proteção contra as ROS produzidas durante o estresse oxidativo. Perfil semelhante ao encontrado em nosso estudo foi observado na análise proteômica de seis cultivares de soja submetidas a condição de inundação, onde a abundância de transcritos de APX2 citosólico (cAPX2) e proteínas cAPX 2 foram significativamente reduzidos (Shi et al., 2008).

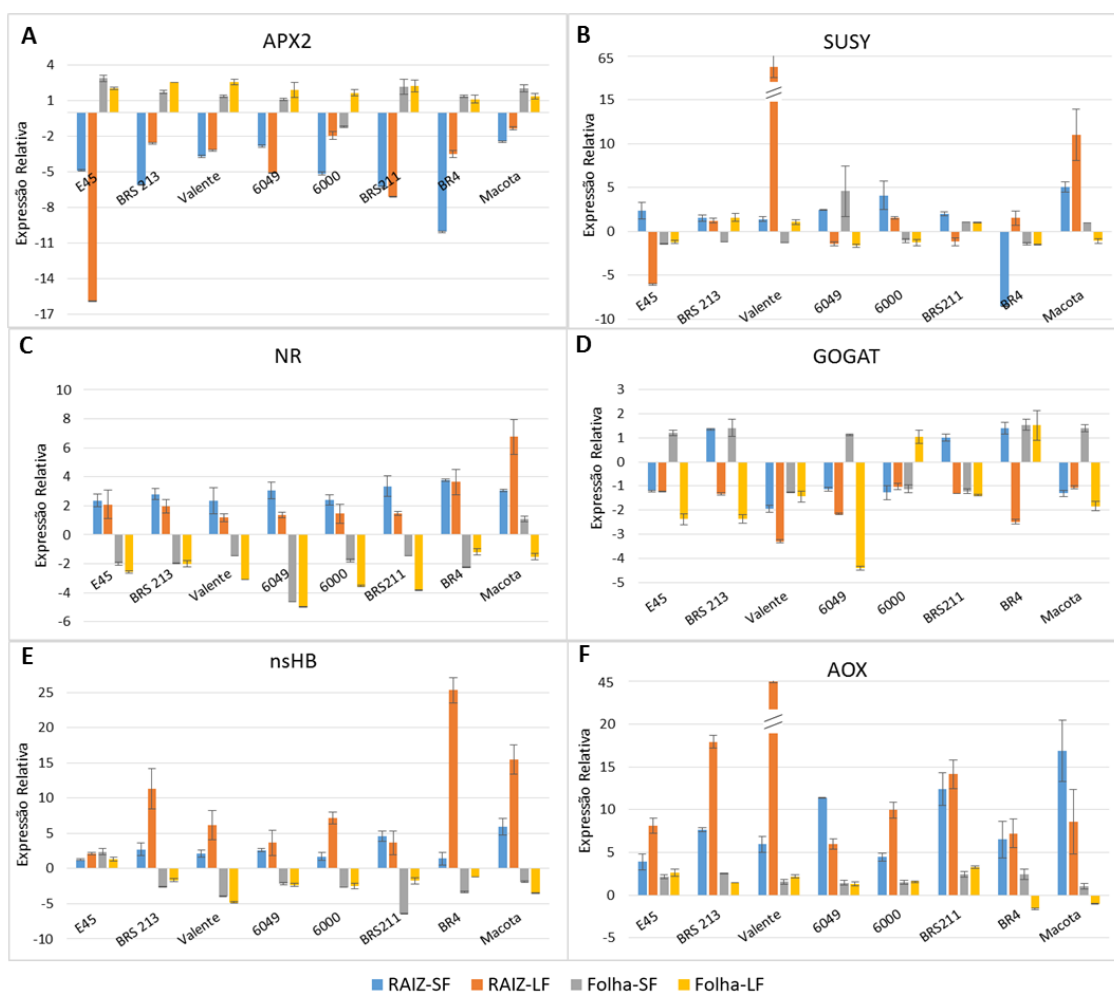


Figura 4 Expressão relativa, em raízes e folhas de genótipos de soja submetidos a dois períodos de encharcamento: curto, 3 dias (SF) e longo, 11 dias (LF). A) Álcool desidrogenase 1 e Álcool desidrogenase 4 (Glyma.04G240800 / Glyma.06G122600); B) Sacarose Sintase 4 (Glyma.13G114000); C) Nitrato redutase 1 (Glyma.06G109200); D) Hemoglobina não-simbionte 1 (Glyma.11G121800); E) Oxidase alternativa 1A (Glyma.04G123800) e F) Ascorbato peroxidase 1 (Glyma.12G073100).

Os genes relacionados à mecanismos de sinalização tais como Prolina-4-hidrolase (P4H) e Trehalose-6-fosfato sintase (TP6) também diferiram no padrão de resposta. Para o gene P4H nas raízes não houve um padrão de resposta relacionado considerando a característica de tolerância dos genótipos ou o tempo de exposição ao encharcamento. Em folhas, o gene P4H foi *up* regulado nos dois tempos de tratamento de encharcamento, com exceção da cultivar Embrapa 45 (tolerante), na qual a expressão foi *down* regulada em LF. O gene TP6 foi *down* regulado nas raízes no SF para todos os genótipos, e *up* regulado no LF com exceção da cultivar BRS211 (sensível) e 6049 (tolerante). Em folhas TP6 foi *up* regulado nos dois tempos (Figura 5B e 5C).

Em raízes o gene da Quinase GmSRK2 foi *down* regulado em todos os genótipos em SF com mudança de perfil de expressão para *up* regulação nos genótipos BMX Valente e PEL-BR11-6000 (tolerante) e BRS Macota (sensível) no tratamento LF. Em folhas, o perfil de expressão observado foi oposto ao identificado em raízes com *up* regulação em todos os genótipos em SF e *down* regulação nos genótipos Embrapa 45, BRS213 (tolerante) e BRS Macota (sensível) no LF (Figura 5D).

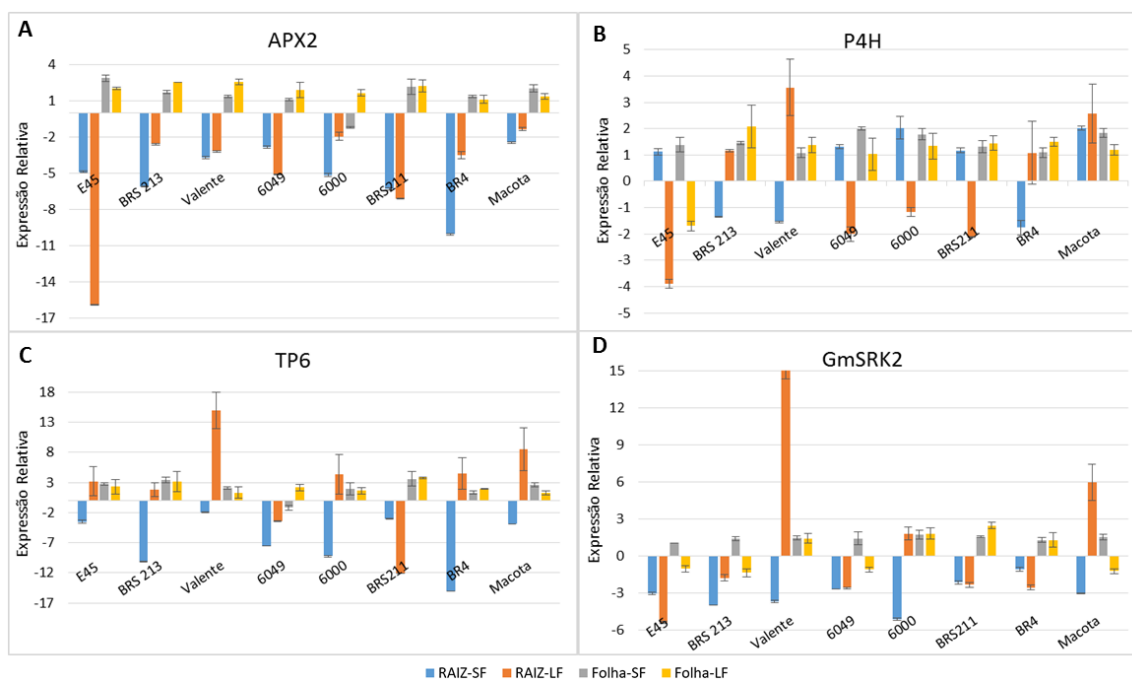


Figura 5 Expressão relativa, em raízes e folhas de genótipos de soja submetidos a dois períodos de encharcamento curto período de encharcamento, 3 dias (SF) e longo período de encharcamento, 11 dias (LF). A) Prolina-4-hidroxilase 1 (Glyma.10G297300); B) Trealose-6-fosfato sintase 11 (Glyma.17G067800); C) quinase GmSRK2 (Glyma.02G135500); D) glutamate synthetase (GOGAT) (Glyma.01G026700).

Dois genes de Alanina aminotransferase (GmAlaAT) foram avaliados, e apresentaram perfis similares de expressão relativa. De modo geral nas raízes estes genes foram *up* regulados em todos os genótipos nos dois períodos de encharcamento, SF e LF, e em folhas foram *down* regulados em todos os genótipos e também nos dois tempos de exposição ao encharcamento (Figura 6A e 6B). Rocha e colaboradores propôseram um modelo metabólico para explicar o papel do acúmulo de alanina em raízes de *Lótus japonicus* durante a hipóxia induzida pelo encharcamento, onde a glicólise e o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) estão ligados à Alanina Aminotransferase resultando no acúmulo de alanina e succinato e a produção de ATP extra sob hipóxia (Rocha et al., 2015).

O gene SAG-clorofila a/b (Cab21) foi *up* regulado nas raízes na maioria dos genótipos no tratamento SF com exceção dos genótipos BRS213 e PEL-BR10-6049 (tolerante), nos quais a expressão foi *down* regulada. Cabe ressaltar que o aumento do tempo de exposição ao encharcamento promoveu aumento no nível de expressão e nos genótipos PEL-BR-10-6000, BRS211 (Sensível) e Embrapa 45 (tolerante) houve mudança do perfil de expressão. Em folhas, Cab21 foi *down* regulado em todos os genótipos em SF e com maior intensidade em LF (Figura 6C). Devido a estrutura das proteínas Cab sugerem-se que estas possam estar envolvidas na biossíntese de clorofila ou outros pigmentos, ou ainda na montagem da membrana tilacóide (Green et al., 1991). Dessa forma, a *down* regulação desse gene teria efeito na redução de clorofila e consequente na redução da fotossíntese, respostas que foram observadas em todos os genótipos avaliados.

As proteínas de ligação clorofila a/b estão intimamente associadas aos fotossistemas I e II e assim, envolvidas na aclimatização fotossintética. Essas proteínas compõem o complexo de coleta de luz (LHC) que consiste nas clorofilas A e B e na proteína de ligação à clorofila AB. Este complexo funciona como um receptor de luz que captura e fornece energia de excitação e sob mudanças nas condições de luz, a fosforilação reversível de proteínas de ligação à clorofila a / b de luz (LHCII) representa um sistema para equilibrar a energia de excitação entre os dois fotossistemas (Kargu et al., 2008).

O gene da enzima de processamento gamma vacuolar (Gamavac) foi *down* regulado nos 2 tempos de encharcamento nas raízes com exceção da cultivar BMX Valente, (tolerante) e BRS Macota (sensível), nos quais no tratamento LF, o gene foi *up* regulado. Nas folhas, Gamavac foi *up* regulado em todos os genótipos (Figura 6D). As

enzimas de processamento vacuolar (VPEs) são cisteínas proteinases localizadas no vacúolo, responsáveis pela maturação de proteínas de armazenamento de sementes e também são conhecidas pelo envolvimento na morte celular programada (MCP) (Prasad et al., 2018). A MCP é importante para vários processos, tais como a diferenciação de elementos traqueais, a formação de tricomas e aerênquima radicular, abscisão de órgãos florais, formação de embriões, modelagem da morfologia de certas folhas entre outros (Gadjev et al., 2008). O processo de MCP pode também pode ser uma consequência de condições abióticas e bióticas severas e pode afetar significativamente o rendimento e a produtividade da planta (Mittler; Blumwald, 2010).

Em resumo, alguns genes apresentaram perfis de expressão similares em relação ao tecido. Assim, ADH e AOX foram *up* regulados nas raízes e folhas, NR, SUSY e nsHB foram *up* regulados nas raízes e *down* regulados nas folhas, e os genes APX2 e GmSRK2 foram *down* regulados nas raízes e *up* regulados nas folhas. As cultivares Embrapa 45 e BRS 213 apresentaram perfis de expressão dos genes avaliados similares, porém divergiram do perfil observado nos demais genótipos considerados tolerantes.

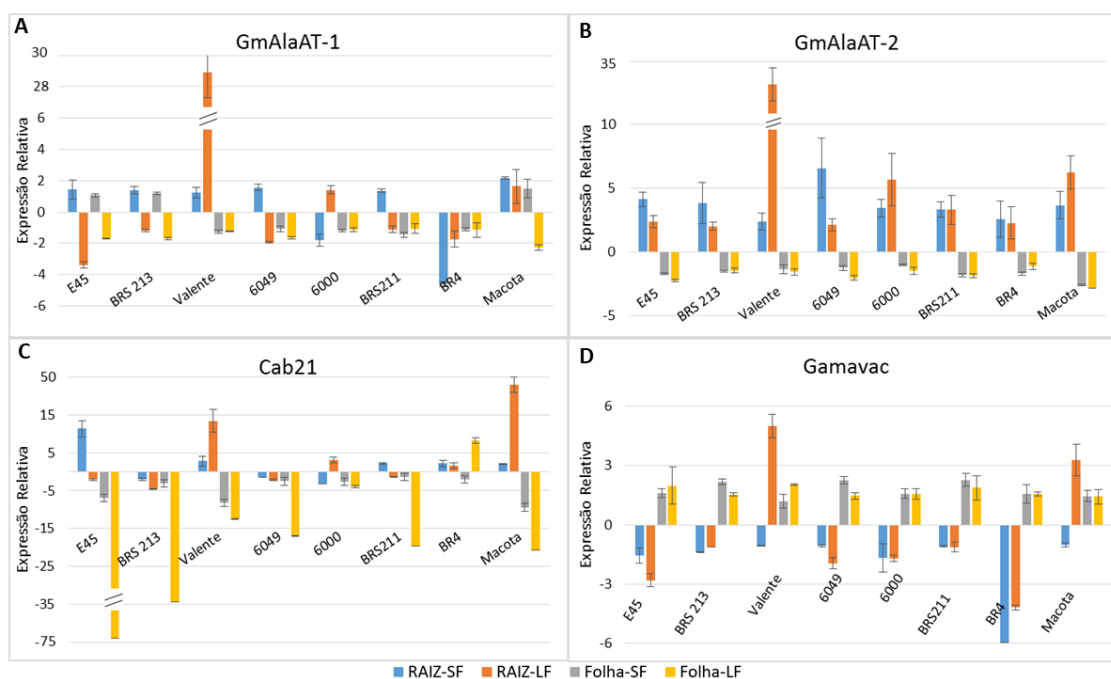


Figura 6 Expressão relativa, em raízes e folhas de genótipos de soja submetidos a dois períodos de encharcamento curto período de encharcamento, 3 dias (SF) e longo período de encharcamento, 11 dias (LF). A) Alanina aminotransferase GmAlaAT1 (Glyma.01G026700); B) Alanina aminotransferase GmAlaAT2 (Glyma. 07G045900); C) SAG - Clorophyll a/b binding protein - Cab21 (Glyma.16G165800) e D) GAMMAVPE gamma vacuolar processing enzyme (Glyma.04G049900).

De modo geral, foi identificada uma tendência de *up* regulação dos genes estudados nos genótipos considerados tolerantes e de *down* regulação nos genótipos considerados sensíveis ao encharcamento. Considerando o período de exposição ao encharcamento, a tendência observada foi de *down* regulação nas raízes no curto período SF com aumento gradual a medida que o tempo de exposição a condição de encharcamento aumentou, atingindo a *up* regulação para maioria dos genótipos em LF. Nas folhas não ocorreu alteração do perfil de expressão e os genes analisados se mantiveram *up* regulados ao longo da exposição ao encharcamento variando apenas na intensidade da *up* regulação que foi reduzida ao longo do período de exposição. Para a maioria dos genes houve influência do tipo de tecido e tempo de exposição à condição de encharcamento na direção e/ou no nível de expressão (Figura 7).

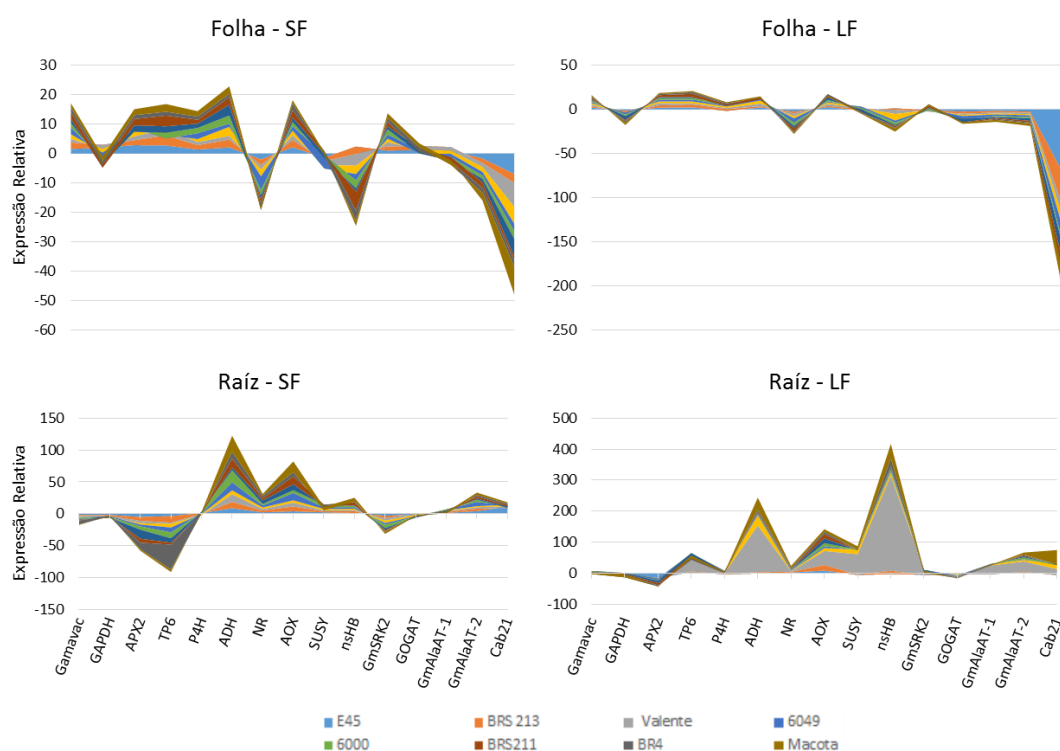


Figura 7 Tendências do perfil de expressão relativa, em raízes e folhas de genótipos de soja submetidos a dois períodos de encharcamento curto período de encharcamento, 3 dias (SF) e longo período de encharcamento, 11 dias (LF) de genes envolvidos nos mecanismos de fermentação, catabolismo de sacarose, ciclo Hb/NO, prevenção e detoxicação de ROS e mecanismos de sinalização relacionados com as respostas das plantas à condição de encharcamento.

2.5. Conclusões

A análise comparativa de genes regulados diferencialmente nas folhas e raízes de genótipos de soja submetidos a dois períodos de encharcamento, assim como as respostas fisiológicas e agronômicas permitiram inferir que os genótipos apresentaram diferenças quanto ao rendimento de grãos e expressão de genes envolvidos nas respostas ao encharcamento. A cultivar BMX Valente se destacou entre os genótipos avaliados, mostrando potencial produtivo para cultivo em áreas de rotação com arroz irrigado. De modo geral, os genótipos tolerantes apresentaram um mecanismo envolvendo inicialmente a mudança de genes relacionados ao ajuste metabólico regulando mais rapidamente a mudança da respiração aeróbica para anaeróbica. Entretanto, é importante ressaltar que uma série de outros mecanismos aqui não investigados se somam para que a planta possa tolerar essa condição ambiental adversa.

2.6. Referências

- Ali, S., Liu, Y., Ishaq, M., Shah, T., Ilyas, A., & Din, I. U. (2017). Climate change and its impact on the yield of major food crops: Evidence from Pakistan. *Foods*, 6(6), 39.
- Allègre, A., Silvestre, J., Morard, P., Kallerhoff, J., & Pinelli, E. (2004). Nitrate reductase regulation in tomato roots by exogenous nitrate: a possible role in tolerance to long-term root anoxia. *Journal of Experimental Botany*, 55(408), 2625-2634.
- Borella, J., Amarante, L. D., Oliveira, D. D. S. C. D., Oliveira, A. C. B. D., & Braga, E. J. B. (2014). Waterlogging-induced changes in fermentative metabolism in roots and nodules of soybean genotypes. *Scientia Agricola*, 71(6), 499-508.
- Brakenridge, G.R., Anderson, E., Kettner, A.J., Slayback, D. and Policelli, F., date accessed 01/02/2019, "Current Flood Conditions, Sheet #", Dartmouth Flood Observatory, University of Colorado, Boulder, CO, USA, <http://floodobservatory.colorado.edu/>.
- Cho, J.W., Yamakawa, T., 2006. Effects on growth and seed yield of small seed soybean cultivars of flooding conditions in paddy field. *Journal-Faculty of Agriculture Kyushu University* 51, 189–193
- Colmer, T. D.; Voisenek, L. A. C. J. (2009) Flooding tolerance: suites of plant traits in variable environments. *Functional plant biology*, v. 36, n. 8, p. 665-681.
- de Carvalho, P. A., de Oliveira, L. E. M., Sodek, L., & de Carvalho, J. N. (2015). Nitrogen metabolism in the roots of rubber tree ('*Hevea brasiliensis*') plants supplied with nitrate or ammonium as nitrogen source during hypoxia. *Australian Journal of Crop Science*, 9(12), 1278.
- DESHMUKH, Rupesh et al. Integrating omic approaches for abiotic stress tolerance in soybean. *Frontiers in Plant science*, v. 5, p. 244, 2014..
- Fantes, C. A., Alves, J. D., Goulart, P. F. P., Deuner, S., Silveira, N. (2010). Respostas fisiológicas em cultivares de soja submetidas ao alagamento em diferentes estádios. *Bragantia*, 69(2).
- Gadjev, I., Stone, J. M., and Gechev, T. S. (2008). Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 270, 87–144. doi: 10.1016/S1937-6448(08)01403-2
- Green, B. R., Pichersky, E., & Kloppstech, K. (1991). Chlorophyll a/b-binding proteins: an extended family. *Trends in biochemical sciences*, 16, 181-186.
- Hirabayashi, Y., Mahendran, R., Koirala, S., Konoshima, L., Yamazaki, D., Watanabe, S., Kim, H. and Kanae, S., (2013). Global flood risk under climate change. *Nature Climate Change*, 3(9), p.816.

Hoff, T., Stummann, B. M., and Henningsen, K. W. (1992). Structure function and regulation of nitrate reductase in higher plants. *Physiol. Plant.* 84, 616–624. doi: 10.1111/j.1399-3054.1992.tb04712.x

Irfan, Mohd et al. Physiological and biochemical changes in plants under waterlogging. *Protoplasma*, v. 241, n. 1-4, p. 3-17, 2010.

Jitsuyama, Y. (2017). Hypoxia-Responsive Root Hydraulic Conductivity Influences Soybean Cultivar-Specific Waterlogging Tolerance. *American Journal of Plant Sciences*, 8(04), 770.

Johnson, L. A., White, P. J., & Galloway, R. (Eds.). (2015). *Soybeans: chemistry, production, processing, and utilization*. Elsevier.

Kargul, J., & Barber, J. (2008). Photosynthetic acclimation: Structural reorganisation of light harvesting antenna—role of redox-dependent phosphorylation of major and minor chlorophyll a/b binding proteins. *The FEBS journal*, 275(6), 1056-1068.

Khatoun A, Rehman S, Hiraga S, Makino T, Komatsu S (2012) Organ-specific proteomics analysis for response mechanism in soybean seedlings under flooding stress. *J Proteomics* 75:5706–5723.

Komatsu, S., Thibaut, D., Hiraga, S., Kato, M., Chiba, M., Hashiguchi, A., & Yasue, H. (2011). Characterization of a novel flooding stress-responsive alcohol dehydrogenase expressed in soybean roots. *Plant molecular biology*, 77(3), 309-322.

Kumutha, D., Sairam, R. K., Ezhilmathi, K., Chinnusamy, V., & Meena, R. C. (2008). Effect of waterlogging on carbohydrate metabolism in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.): upregulation of sucrose synthase and alcohol dehydrogenase. *Plant Science*, 175(5), 706-716.

Lekshmy S., Jha SK, Sairam RK (2015) Mecanismos Fisiológicos e Moleculares da Tolerância à Inundação em Plantas. In: Pandey G. (eds) *Elucidación da Sinalização do Estresse Abiótico em Plantas*. Springer, Nova Iorque, NY

Loretí, Elena; Van Veen, Hans; Perata, Pierdomenico. Plant responses to flooding stress. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 33, p. 64-71, 2016.

Ludwig, M. P., Schuch, L. O. B., de Oliveira, S., Junior, F. J. V., Lemes, E. S., Correa, M. F., Seus, R. (2016). Desempenho morfofisiológico de cultivares de soja de ciclo precoce sob alagamento do solo. *Revista Cultivando o Saber*, 9(1), 32-50. ISSN 2175-2214

Mittler, R. e Blumwald, E. (2010). Engenharia genética para a agricultura moderna: desafios e perspectivas. *Annu Rev. Plant Biol.* 61, 443-462. doi: 10.1146 / annurev-arplant-042809-112116

Nanjo Y, Skultety L, Uváčková L, Klubicová K, Hajduch M, Komatsu S (2012) Mass spectrometry-based analysis of proteomic changes in the root tips of flooded soybean seedlings. *J Proteome Res* 11: 372–385.

- Patel, P. K., Singh, A. K., Tripathi, N., Yadav, D., & Hemantaranjan, A. (2014). Flooding: abiotic constraint limiting vegetable productivity. *Advances in Plants and Agriculture Research*, 1.
- Pedersen, O., Perata, P., & Voesenek, L. A. (2017). Flooding and low oxygen responses in plants. *Functional Plant Biology*, 44(9), iii-vi.
- Prasad, S. C., Kisku, A. V., & Sarin, N. B. (2018). Understanding the gamma-vacuolar processing enzyme gene regulation by promoter-GUS fusion approach. *Plant Archives*, 18(1), 679-689.
- Ray, D. K., Gerber, J. S., MacDonald, G. K., & West, P. C. (2015). Climate variation explains a third of global crop yield variability. *Nature communications*, 6, 5989.
- Ren, B., Dong, S., Zhao, B., Liu, P., & Zhang, J. (2017). Responses of nitrogen metabolism, uptake and translocation of maize to waterlogging at different growth stages. *Frontiers in plant science*, 8, 1216.
- Rhine, M. D., Stevens, G., Shannon, G., Wrather, A., & Sleper, D. (2010). Yield and nutritional responses to waterlogging of soybean cultivars. *Irrigation science*, 28(2), 135-142.
- Rocha, M., Licausi, F., Araujo, W. L., Nunes-Nesi, A., Sodek, L., Fernie, A. R., & van Dongen, J. T. (2010). Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, 152(3), 1501-1513.
- Sairam, R. K., Kumutha, D., Ezhilmathi, K., Deshmukh, P. S., & Srivastava, G. C. (2008). Physiology and biochemistry of waterlogging tolerance in plants. *Biologia plantarum*, 52(3), 401.
- Salavati, A., Khatoon, A., Nanjo, Y., & Komatsu, S. (2012). Analysis of proteomic changes in roots of soybean seedlings during recovery after flooding. *Journal of proteomics*, 75(3), 878-893.
- Schlenker, W. (2018). Introduction to "Understanding Productivity Growth in Agriculture". In *Understanding Productivity Growth in Agriculture*. University of Chicago Press.
- Shi F, Yamamoto R, Shimamura S, et al. (2008) Cytosolic ascorbate peroxidase 2 (cAPX 2) is involved in the soybean response to flooding. *Phytochemistry* 69: 1295–1303
- Sharma, P. C., Kumar, A., & Vineeth, T. V. (2017). Current Trends in Salinity and Waterlogging Tolerance. In *Abiotic Stress Management for Resilient Agriculture* (pp. 177-220). Springer, Singapore
- Shimamura, S., Yamamoto, R., Nakamura, T., Shimada, S. e Komatsu, S. (2010). Lenticelas hipertróficas de caule e aerênquima secundário possibilitam o transporte de oxigênio para raízes de soja em solo alagado. *Annals of Botany*

- Souza, R.; Camargo, F.A.O; Val, L.C.(2015) Solos alagados (reações de redox). In: Meurer, E. J. (Ed.). Fundamentos de Química do Solo 6ª edição. Porto Alegre, Evangraf, p.177-200.
- Steffens, B., & Rasmussen, A. (2016). The physiology of adventitious roots. *Plant Physiology*, 170(2), 603-617.
- Steffens, B., Steffen-Heins, A., & Sauter, M. (2013). Reactive oxygen species mediate growth and death in submerged plants. *Frontiers in Plant Science*, 4, 179.
- Striker, G. G.. Flooding stress on plants: anatomical, morphological and physiological responses. In: Botany. InTech, 2012
- Sullivan, M., VanToai, T., Fausey, N., Beuerlein, J., Parkinson, R., & Soboyejo, A. (2001). Evaluating on-farm flooding impacts on soybean. *Crop Science*, 41(1), 93-100.
- Thomas, A.L.; Lange, C.E. Soja em solos de várzea do Sul do Brasil. Porto Alegre: Evangraf, 2014. 128p.
- Tournaire-Roux, C., Sutka, M., Javot, H., Gout, E., Gerbeau, P., Luu, D. T., ... & Maurel, C. (2003). Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature*, 425(6956), 393.
- Vanlerberghe, G. C., Martyn, G. D., & Dahal, K. (2016). Alternative oxidase: a respiratory electron transport chain pathway essential for maintaining photosynthetic performance during drought stress. *Physiologia plantarum*, 157(3), 322-337.
- Vedalgo, A Edelago, A.; Carmona, F. de C.; Boeni, M.; Lange, C. E.; Anghinoni, I. Fertilidade e aptidão de uso dos solos para o cultivo da soja nas regiões arrozeiras do Rio Grande do Sul. (2012). IRGA Boletim técnico no 12, Cachoeirinha. Starprodutora, 48p
- Vidoz, M. L., Loreti, E., Mensuali, A., Alpi, A., & Perata, P. (2010). Hormonal interplay during adventitious root formation in flooded tomato plants. *The Plant Journal*, 63(4), 551-562.
- Wu, C., Chen, P., Hummer, W., Zeng, A., & Klepadlo, M. (2017). Effect of flood stress on soybean seed germination in the field. *Am J Plant Sci*, 8, 53-68.
- Yamasaki, H., & Sakihama, Y. (2000). Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS letters*, 468(1), 89-92.
- Zhang, Q., Huber, H., Beljaars, S. J., Birnbaum, D., de Best, S., de Kroon, H., & Visser, E. J. (2017). Benefits of flooding-induced aquatic adventitious roots depend on the duration of submergence: linking plant performance to root functioning. *Annals of botany*, 120(1), 171-180.
- Zhang, X., Lin, H. M., Hu, H., Hu, X., & Hu, L. (2016). Gamma-aminobutyric acid mediates nicotine biosynthesis in tobacco under flooding stress. *Plant diversity*, 38(1), 53-58.

3. CAPÍTULO 3: Expression profile of miRNAs in soybean roots under hypoxia

Silvana R R Marin^{1,2}, Mayla D C Molinari^{1,2}, Renata Fuganti Pagliarini³, Matheus de Souza Gomes⁴; Tamires Alves⁴, Laurence Amaral⁴, Liliane M M Henning¹, Alexandre Lima Nepomuceno¹

1. Embrapa Soybean. Rodovia Carlos João Strass. Acesso Orlando Amaral. Warta. PO. Box 231 86001-970, Londrina, PR, Brazil

2. Londrina State University – Biological Sciences Center. P.O. 10.011, 86057-970, Londrina, PR, Brazil./Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES)

3. Embrapa Soybean. Rodovia Carlos João Strass. Acesso Orlando Amaral. Warta. PO. Box 231 86001-970, Londrina, PR, Brazil./National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)

4. Universidade Federal de Uberlândia - Campus Patos de Minas (UFU)

3.1. Abstract

Most plants are sensitive to flooding conditions, where drastic reduction of oxygen availability restricts respiration and affects plant survival and development. However, to survive in this environment, a broad spectrum of adaptive responses was developed by plants, which eventually results in tolerance. The complexity of these responses is related to a large number of mechanisms and processes linked to gene regulation, among which microRNAs (miRNAs) are considered to be the main class of regulators; acting in various biological processes, such as growth, development and adaptation to biotic and abiotic stresses. Flooding tolerance is an important trait in some soybean production areas, but, to date, no studies have reported the expression profile of miRNA in soybean under the condition of reduced oxygen availability. In this study, we presented and analyzed data on the expression profile of miRNAs and their potential regulation targets in soybean roots under hypoxic conditions at Embrapa 45 and BR 4 cultivars, considered respectively, as tolerant and sensitive to flooding, thus we investigated the role of miRNAs in this two genotypes. Results identified 137 miRNAs expressed, of which 67 were classified as conserved between different species and 70 were reported exclusively in soybean. From this total, 101 miRNAs remained stable in both normoxia and hypoxia conditions, and 36 miRNAs showed different expression profiles among the cultivars. In the sensitive cultivar BR 4, the level of expression of these miRNAs remained stable, or was positively regulated, whereas tolerant cultivar Embrapa 45 presented 72% of miRNAs negatively regulated, suggesting the involvement of miRNAs as regulators of gene expression in soybean roots, under both normoxia and hypoxia conditions. Prediction data of miRNAs target genes showed that gma-miRNAs identified potentially regulate gene expression of transcription factors, signaling and primary metabolism adjustment genes involved in the induction of fermentation, glycolysis and starch degradation, proposing the participation of these

gma-miRNAs in the regulation of genes related to plant responses to hypoxia, so treatment and genotype dependent. Our study provided unprecedented data on the expression profile of miRNAs in soybean roots under hypoxia in two discrepant-flooding-tolerance genotypes.

Keywords: *Glycine max*, soybean, miRNAs, hypoxia, flooding

3.2. Introduction

Soybean is an important source of oil and protein for human and animal feeding, and has wide applicability in the pharmaceutical and chemical industries (Deshmukh et al., 2014). Economically, the grain is the most traded agricultural commodity, accounting for more than 10% of the total value of global agricultural trade (Lee et al., 2016).

However, productivity and spatial distribution of important crops such as soybean can be severely limited by environmental constraints. Among these environmental restrictions, temporary or permanent flooding conditions are a global problem that, although in several regions, are rare events, in others are a chronic problem, constantly faced by producers and resulting in serious damages and losses (Ali et al., 2017).

In this context, if climate changes projections which predict an increase in extreme weather events, among them in the rainfall regime, are confirmed; basic scientific research aimed at understanding responses of plants to flooding will be fundamental in the coming decades for the sustainability of agriculture and food security of a growing global population.

In addition to climate restrictions, many areas are subject to flooding conditions due to soil characteristics that prevent drainage, and in these areas, the crop is restricted to species adapted to this condition, such as rice. However, extensive cultivation of the same crop increases the incidence of diseases, pests and weeds. In this situation, rotation and / or succession of crops, with sporadic replacement by rainfed crops such as soybeans, may be a sustainable management option with the potential to minimize these problems (Pinto et al., 2006).

In general, changes in oxygen concentration due to soil flooding alter various aspects of plant metabolism, limit energy production once oxidative phosphorylation is stopped, reducing the production of ATPs, which happens to occur through the fermentation route, harming plant metabolism (Bailey-Serres and Voisenek, 2008;

Sharma et al., 2017). Genetically, oxygen restriction leads to very sensitive molecular responses that affect soybean growth and yield (Komatsu et al., 2009; Nakayama et al., 2017).

The complex integration of molecular, biochemical and physiological responses of plants implies not only in transcriptional and translational regulation of specific genes, but also to post-transcriptional and post-translational regulatory mechanisms. Understanding this intricate regulatory network can provide important information in the development of soybean lines capable of growing and developing under oxygen deficient conditions without loss of production. Among these important gene expression regulators, microRNAs (miRNAs), which are small, non-coding RNAs, conserved throughout evolution, have been shown to repress gene expression at the post-transcriptional level by binding to a complementary target mRNA, thus mediating the inhibition, degradation or cleavage of the translation (Bartel, 2004; 2009). Some miRNAs show constitutive expressed, while others are subject to temporal and tissue-specific expression control.

Studies with different plant species under hypoxia have identified changes in the abundance of miRNAs associated with this condition. In *Arabidopsis*, 46 miRNAs expressed in roots under hypoxia conditions were identified, including miR159, miR166, miR167, miR168, miR169 and miR172 (Moldovan et al., 2009). In maize roots under long flooding period (1, 2 and 3 days), 32 miRNAs were identified (Zhai et al., 2013). Still in maize, in a short flooding period (1 h, 2 h and 4 h), miRNAs miR159, miR164, miR167, miR393, miR408 and miR528 were considered key regulators of gene expression under O₂ deficiency (Liu et al., 2012). In lotus (*Nelumbo nucifera Gaertn*) miR159, miR393h and miR319c-3p were also reported as important regulators in gene expression (Jin et al., 2017). Specifically in soybean crop, many studies have related miRNAs with responses to different abiotic stresses such as salinity (Li et al., 2011), drought (Kulcheski et al., 2011), toxicity by aluminum (Zeng et al., 2012) and biotic disturbance such as the Soybean Asian rust (Kulcheski et al., 2011), nematode (Li et al., 2012, Tian et al., 2017) and *Phytophthora* (Guo et al., 2011; Wong et al., 2014). miRNAs involved in nitrogen nodulation and fixation were also reported (Yan et al., 2015, 2016). However, for hypoxic condition, no study that contemplates the miRNAs profile in soybean was published. Thus, the objective of this work was to present a comprehensive profile of miRNAs and their potential target genes in soybean cultivars discrepant for flood tolerance, in three different treatment periods of oxygen restriction.

The data obtained here may help to elucidate the regulation of plant response mechanisms to this adverse environmental condition, which may soon be more of a concern for soy producers in Brazil and in the world.

3.3. Results and discussion

3.3.1. Induction of hypoxia condition

In studies with the objective of simulate environmental conditions such as flooding, it is important to ensure that the experimental treatment imposed will be sufficient to induce the expected plant responses. Thus, the monitoring of O₂ concentration in the nutrient solution where soybean plants were grown indicated that, during the conduction of the experiment, O₂ concentration registered in normoxia condition was between 5.5 and 7.6 mg/L and for the treatment of hypoxia, O₂ concentration ranged between 0.35 and 0.80 mg/L. According to Nakayama and co-workers (2014) these conditions are appropriate for the induction of hypoxia in plant roots.

Hypoxia treatment times analyzed, which were 30 min, 4h and 28h, were also adequate to evaluate the different levels of plant response to hypoxia condition. According to Sharma and co-workers (2017) plants respond to conditions of low oxygen content in three distinct stages. Initially, after the induction of hypoxia, the signal transfer occurs within 4 hours, then the metabolic reprogramming happens between 4h and 24h, and finally, the morphological transformations triggered by the first two steps appear between 24h and 48h after hypoxia perception. Therefore, treatment times covered in this study comprised all three stages of responses, suggesting that the data obtained here might illustrate a broad response profile of the examined soybean cultivars to the flood condition.

Furthermore, in order to guarantee the perception of the flooding condition and consequently the activation of molecular mechanisms responses in plants, the expression of the enzyme alcohol dehydrogenase (ADH) was evaluated as a stress marker. This key enzyme in alcoholic fermentation is highly conserved among species and the expression of ADH is a response mechanism to oxygen restriction essential for plant survival, acting in a short term. ADH enzyme is responsible for the interconversion of acetaldehyde and ethanol with simultaneous recycling of NADH in NAD, aiming glycolysis continuousness, the main source of energy under anoxia

(Komatsu et al., 2011). The obtained results showed that ADH enzyme was highly induced in the three periods of hypoxia in both soybean cultivars (Figure 1), indicating that the imposed treatment was sufficient to induce and activate the cellular machinery triggered in defense to flooding conditions. The level of ADH expression at 30 min was similar for both soybean cultivars, however, for BR 4, considered sensitive to hypoxia condition, the highest expression of ADH enzyme occurred after 4h, with the most significant reduction in gene expression happening after 28h of hypoxia, when compared to Embrapa 45 the tolerant cultivar, which kept the levels of ADH expression more stable at 4h and 28h sampled times.

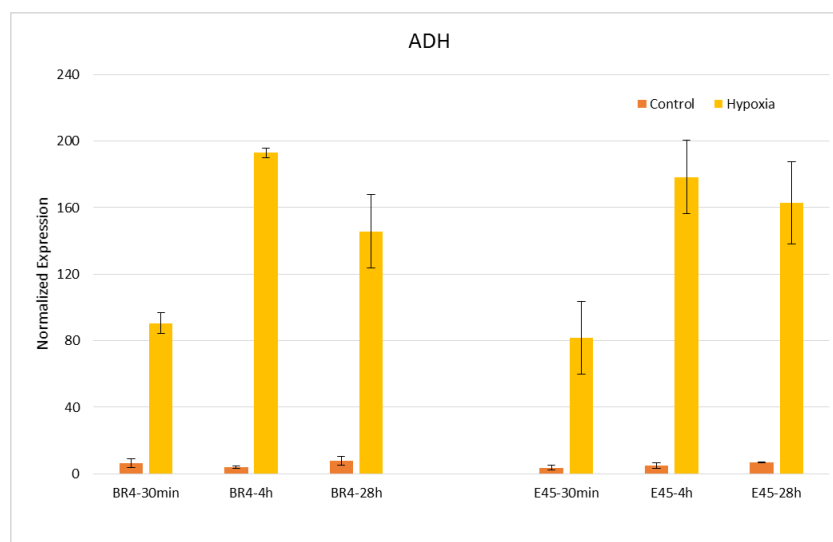


Figure 1 Normalized expression of ADH gene (Glyma.04G240800), encoding alcohol dehydrogenase (EC1.1.1.1) enzyme in soybean cultivars BR 4 and Embrapa 45, respectively, considered sensitive and tolerant to hypoxia, in normoxia (control) and in the three treatment sampling times (30 m, 4h and 28h) under hypoxia conditions.

Komatsu and co-workers (2011) also observed the expression of ADH in soybean roots in response to flooding. Corroborating the importance of ADH for tolerance to flooding in plants, in common beans a positive regulation of sucrose synthase and ADH was identified under submergence (Sairam et al., 2009), and in rice (Kato-Noguchi; Morokuma 2007), both ADH activity and ethanol synthesis were higher in varieties more tolerant to hypoxia. Thus, considering the activation ADH enzyme, it can be affirmed that the choice of the hydroponic system and the imposition of hypoxia by N₂ gas infiltration simulated the O₂ deficiency condition in soybean roots, and therefore, the perception of the stress, signaling and activation of various response mechanisms.

3.3.2. Overview of miRNA libraries

In order to broadly analyze the miRNA profile in soybean roots submitted to hypoxia conditions, the three treatment times (30 min, 4h and 28h), which contemplated the different phases of plant response to O₂ deficiency (Sharma et al., 2017), were harvested and bulked for the synthesis of small RNAs libraries. Results showed respectively, 9.703.352, 8.018.109, 6.964.716 and 4.498.266 reads for libraries obtained from soybean cultivars BR 4 under normoxia (BR4-C) and under hypoxia (BR4-H), and Embrapa 45 under normoxia (E45-C) and hypoxia (E45-H) (Table 1). When compared to the tolerant cultivar Embrapa 45, the susceptible cultivar, BR 4 presented a higher number of reads in both treatment conditions, but mainly under hypoxia.

Table 1 Composition of miRNA libraries from soybean roots of BR 4 and Embrapa 45 cultivars, considered, respectively, sensitive and tolerant to normoxia and hypoxia conditions.

Parameters	BR 4				Embrapa 45			
	Normoxia		Hypoxia		Normoxia		Hipoxia	
	Unique	Total	Unique	Total	Unique	Total	Unique	Total
<i>Raw Reads</i>	1.814.383	9.703.352	1.786.737	8.018.109	1.636.773	6.964.716	1.013.541	4.498.266
<i>Cleaned Reads (15–30 nt)</i>								
miRNAs	1520559	7739962	1708695	7697095	1542194	6519416	860672	3750738
<i>Reads without alignment in the genome</i>	875783	2110862	1019691	2605483	845139	1881431	457280	942813
<i>Reads aligned in the genome</i>	644776	5629100	689004	5091612	697055	4637985	403392	2807925
<i>Matching Rfam database</i>	149741	1531053	206435	2016972	176681	1635253	87626	751113
rRNA	84293	1189157	114500	1577728	103161	1299743	47264	571937
tRNA	35911	168584	50415	222154	38286	162423	22107	91739
snoRNA	3686	9609	5404	17374	4872	13144	2681	8328
snRNA	3096	7186	3923	10009	3552	8059	1887	3840
others	22755	156517	32193	189707	26810	151884	13687	75269
<i>Unknow Reads</i>	494828	3711796	482352	2684433	520163	2640060	315584	1843650

After the pre-processing of raw data, between 19.5% and 23.5% of the reads were identified as unique. Among the single reads, from 40 to 47% aligned in the soybean reference genome. Tolerant-cultivar Embrapa 45 presented the lowest number of aligned-reads when compared to cultivar BR 4, being 28.2% lower in the normoxia and 43.9% in the hypoxia condition. Other known non-coding RNAs, such as rRNAs, tRNAs and snoRNAs, represented, respectively, 23.2%, 29.9%, 25.3% and 21.7% of the small RNAs in BR4-C, BR4-H, E45-C and E45-H (Table 1), evidencing the complexity of small RNAs population in soybean.

Analyzing the sequence size of the small RNAs (sRNAs) identified in the libraries, peaks were observed for sRNAs with sizes of 17, 21 and 24 nucleotides (Figure 2A). In general, plant genomes encode several small RNAs that show between 19 and 31 nucleotides (nt) in length and function in distinct but overlapping regulatory pathways that act on mRNA degradation, translation repression, heterochromatin formation and transposon control (Chu et al., 2007, Borges et al., 2015). The length of the sequence of an sRNA is an indicator of its biogenetic pathway and functionality according to its class of small corresponding RNA (Chu et al., 2007; Starega-Roslan et al., 2010) and, therefore, the analysis of small RNAs average size in each study condition is informative. Classes of sRNAs include 19-25 nt-length miRNAs, 19-21 nt siRNAs, trans-acting siRNAs (tasiRNAs) with 21-22 nt, scnRNAs that are scanning sRNAs with approximately 28 nt, repetition-associated siRNAs (rasiRNA) with 24-27 nt and piRNAs interacting with Piwi proteins with 26-31 nt (Chu et al., 2007). In plants the main classes of small RNAs are miRNAs and siRNAs, (Borges et al., 2015) as identified in our roots libraries.

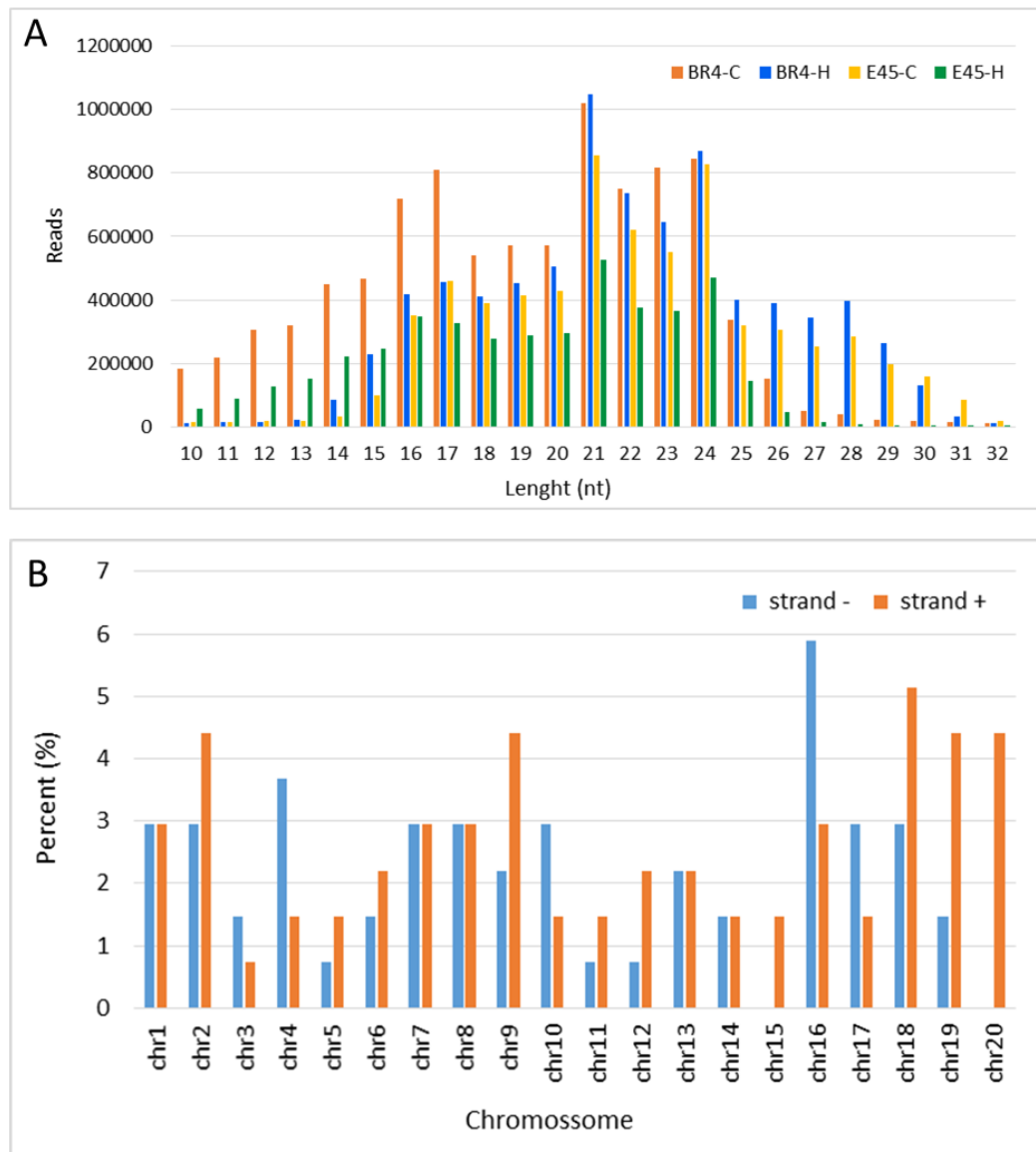


Figure 2 Characterization of miRNAs. A) Distribution of sequence lengths of the small RNAs found in the libraries of soybean roots from cultivars BR 4 and Embrapa 45 under conditions of normoxia (BR4-C and E45-C) and hypoxia (BR4-H and E45-H) and in, B) Distribution of the miRNA in both strands of the chromosomes.

The sRNA library from sensitive cultivar BR 4 showed a greater number of sequences between 17 and 20 nucleotides in the normoxia condition and in the treatment of hypoxia, a larger number of sequences between 24 and 30 nucleotides, whereas Embrapa 45 cultivar presented an opposite profile (Figure 2A). The variation in size of sRNAs as a function of genotype suggests the occurrence of different classes of sRNAs acting on different response pathways into the different levels of flood tolerance.

3.3.4. Profile of mature miRNAs in soybean roots under hypoxia and normoxia

To identify gma-miRNAs, processed reads were aligned against soybean miRNAs available in miRBase database. Only identical readings were considered as mature gma-miRNAs. For BR4-C, BR4-H, E45-C and E45H libraries, 105, 119, 111 and 92 mature gma-miRNAs were expressed, respectively. The miRNAs were distributed on the 20 soybean chromosomes, located 55.5% on the positive and 44.5% on the negative strand (Figure 2B).

The combined comparison between the gma-miRNAs expressed in all four libraries (BR4-C, BR4-H, E45-C and E45H) resulted in 137 gma-miRNAs, of which 89 were classified according to mirBase into 52 families, 48 as single miRNAs and soybean-specific without family classification (Supplementary Table S1). Among the identified families, 35 miRNAs show conservancy among different species and in 13 families, members were reported only in soybean (Supplementary Table S1). In *Arabidopsis* under hypoxia condition, 19 miRNAs families were identified expressed in roots, including miR159, miR166, miR167, miR168, miR169 and miR172 (Moldovan et al., 2009). Some of these miRNAs were also found in maize roots under long (1, 2 and 3 days) (Zhai et al., 2013) and short (1 h, 2 h and 4 h) flooding periods (Liu et al., 2012).

Soy-specific miRNAs may be younger genes originated after the divergence between eudicots and monocotyledons. Nozawa and co-workers (2012) in a study on the origin and evolution of miRNA genes in plant species, inferred that unique miRNA genes are generally younger and species-specific, while miRNA genes that form multigenic families are older and tend to have essential functions related to the development of plants. According to Taylor et al. (2014) most of the miRNAs are ancient, and there is no relationship between the complexity of the organism and the evolution of plant miRNAs. However, in soybeans it has been reported that miRNAs as well as their target genes undergo selection pressure due to the domestication and crop breeding (Liu et al., 2016). Thus, the presence of conserved and soybean-specific miRNAs suggests that conserved miRNAs could regulate aspects common to plants, such as plant morphology and developmental phase change, and that specific miRNAs might control unique processes, such as response to deficiency oxygen (as covered in this work), and thus both conserved and specific miRNAs may play an important role in plants response to abiotic conditions.

In the combined comparison between the gma-miRNAs expressed in all four libraries (BR4-C, BR4-H, E45-C and E45H), 20 gma-miRNAs were found exclusively in the flood-sensitive cultivar BR 4, while in the tolerant cultivar Embrapa 45, only 8 gma-miRNAs were identified (Figure 3A), suggesting a more complex regulation of flood response in the cultivar sensitive to hypoxia condition. The gma-miRNAs families gma-miR156, gma-miR171 and gma-miR172 were the more abundant presenting 4 elements each, with abundance and expression regulation variable between cultivars (Supplementary Table S1).

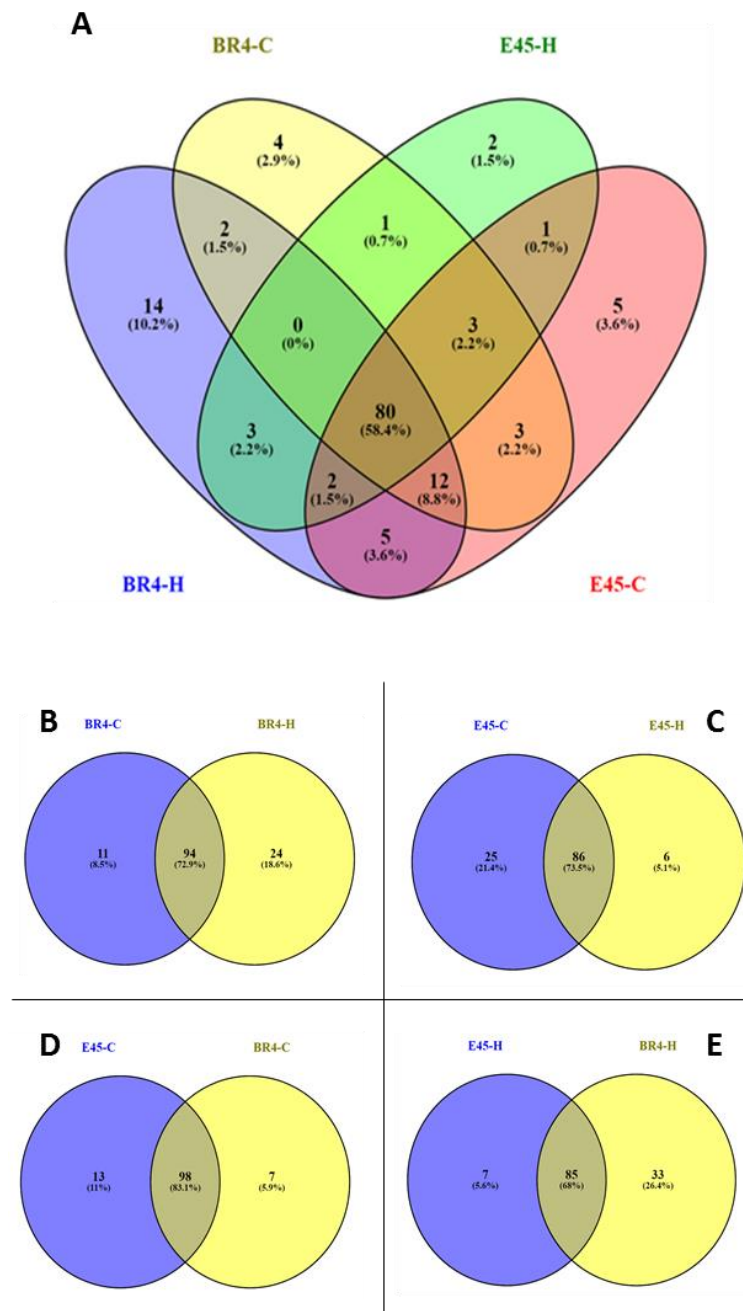


Figure 3 Venn Diagrams. In A) Combined comparison between the gma-miRNAs expressed in soybean cultivars BR 4 and Embrapa 45 in normoxia (control) and hypoxia conditions. Evaluation of genotype effect and oxygen availability in the expression of gma-miRNAs. In B) Comparison between normoxia and hypoxia conditions in sensitive cultivar BR 4. In C) Comparison between normoxia and hypoxia conditions in tolerant cultivar Embrapa 45. In D) Comparison between Embrapa 45 and BR 4 cultivars in normoxia (control) condition and in E) Comparison between cultivars Embrapa 45 and BR 4 in hypoxia condition.

In soybean, the miR156 family is composed of 28 putative members; miR171 family comprised of 21 members and miR172 family grouped 15 members. These miRNAs are reported to be involved in plant growth and development. In *Arabidopsis*

the mature members of miR156 and miR172 families are reported to be involved in the transition from the juvenile phase to the adult phase. miR156 shows high expression in the juvenile phase and its expression decreases as the plant ages. The miR172 shows a complementary expression pattern, i.e., low levels during the juvenile phase and high during the adult phase (Fornara and Coupland, 2009). Nonetheless, miR172 was also identified in *A. thaliana* roots under hypoxia (Moldovan et al., 2009). In addition, some studies have suggested the involvement of miR172 in response to abiotic conditions such as drought, cold, heat and cadmium (Sunkar et al., 2012; Zhou et al., 2012). In sunflower, miR172 was also suggested to act on epigenetic responses to these same adverse environmental conditions (Ebrahimi Khaksefidi et al., 2015).

The miR171 family, in tomato, regulates the expression of GRAS target genes, participating in several physiological processes including maintenance of the apical meristem, axillary bud formation, flowering time, chlorophyll biosynthesis and distribution of trichomes through the regulation of gibberellin and auxin homeostasis (Huang et al., 2017). Also, miR171 and its target genes SCLs finely regulate chlorophyll biosynthesis through a feedback loop (Ma et al., 2014). In addition, members of the miR171 family were reported to be involved in the response to drought in potato (Hwang et al., 2011), suggesting their involvement in the regulation of responses to abiotic conditions.

Therefore, the most abundant and common miRNAs identified in both soybean cultivars appear to act depending on the treatment condition in which the plant is exposed, targeting various pathways and cellular processes to assist both plant development and dealing with abiotic stress conditions. It has been reported that in *Arabidopsis* under hypoxia condition, microRNAs from miR156, miR157, miR166 and miR172 families may be involved in the control or inhibition of root growth, as well as redirecting root development when normoxia condition is resumed (Moldovan et al., 2009). Based on this report, it can be suggested that also in soybean, gma-miR156 and gma-miR172 families may be related to root development in normoxia condition and in the development of adventitious roots in hypoxia condition.

Analyzing separately the effect of genotype and the availability of oxygen on the expressed gma-miRNAs, a small variation in the total number of gma-miRNAs expressed between both cultivars was observed. In sensitive-cultivar BR 4, 129 gma-miRNAs were identified; while in tolerant-cultivar Embrapa 45 117 gma-miRNAs were found. Approximately 73% of these miRNAs were common to hypoxia and normoxia

conditions in each of the cultivars. However, the 27% remaining miRNAs in each cultivar responded in an antagonistic way. In BR 4 cultivar, 11 unique gma-miRNAs were identified in normoxia and 24 gma-miRNAs were exclusive identified in hypoxia condition. Whereas in Embrapa 45 cultivar, 25 gma-miRNAs were identified exclusively for normoxia and only 6 gma-miRNAs were found in hypoxia treatment (Figure 3B and 3C). These data suggest the involvement of miRNAs in the regulation of different processes that culminate in plant tolerance in a stress-dependent manner. The differential expression of some miRNAs in a stress-dependent manner has also been reported in other studies. Specifically in response to abiotic stresses, it was observed that in *Arabidopsis* miR398 showed induced expression by drought (Zhou et al., 2007), but inhibited by oxidative (Sunkar et al., 2006), ABA and salt (NaCl) (Jia et al., 2009) treatments. Still in *A. thaliana*, miR169 was negatively regulated by water stress through an ABA-dependent pathway (Li et al., 2008), but was induced by salinity treatment (Zhao et al., 2009).

Similar behavior was observed when miRNAs expressed in both soybean genotypes were compared in the same oxygen availability treatment. Thus, in normoxia and hypoxia conditions, 118 and 125 gma-miRNAs were identified, respectively. In the condition of normoxia, 83% of the identified miRNAs were common to both cultivars, whereas in hypoxia condition 68% of the miRNAs were common between the two cultivars. In this comparison, the antagonistic behavior between the expressions of miRNAs identified in the cultivars and in the two conditions was again evidenced. Therefore, in cultivar BR 4, 7 gma-miRNAs were expressed in normoxia condition, but under hypoxia treatment, the number of gma-miRNAs increased to 33. In the Embrapa 45 cultivar, the observed profile was opposite, presenting higher number of gma-miRNAs expressed in normoxia condition (13 miRNAs) in relation to hypoxia condition (7 miRNAs) (Figure 3D and 3E). This data once again suggests that the processes involved in gene regulation related to tolerance and sensitivity to flooding are different in the two cultivars discrepant for the characteristic. Thus, a higher number of miRNAs are expressed in hypoxia condition in the sensitive cultivar, while in the tolerant cultivar this occurs in the control condition, suggesting that miRNA expression in response to hypoxia is genotype dependent, and that the regulation of response mechanisms activated in the two soybean cultivars are different when plants face limited oxygen condition. Understanding these molecular mechanisms can elucidate

which tolerance strategies are activated or silenced in soybean cultivars under oxygen deficiency conditions.

Some studies have also reported a pattern of miRNA responses in a genotype-dependent manner in abiotic stresses. The analysis of two cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) with contrasting responses to drought identified the differential expression of 20 miRNAs, nine of which were expressed in only one genotype, and 11 miRNAs were regulated by drought condition exclusively in another genotype (Barrera-Figueroa et al. 2011). Differences in miRNA expression patterns between two soybean genotypes, one sensitive and other tolerant to cadmium were detected using microarray. A total of 26 cadmium-responsive miRNAs were identified, of which nine were detected in both cultivars, while five were expressed only in the tolerant cultivar and 12 miRNAs just in the sensitive cultivar (Fang et al., 2013). In addition, in two cotton (*Gossypium spp.*) cultivars with contrasting responses to salinity treatment, 12 miRNAs were expressed in a specific genotype pattern, in which four miRNAs (miR156, miR169, miR535 and miR827) showed high expression and three miRNAs (miR167, miR397 and miR399) presented inhibited expression in the sensitive cultivar (Yin et al., 2012).

Furthermore, to the variation in relation to the different miRNAs identified, there was also a difference between the counts of the miRNAs common to the sensitive and tolerant soybean cultivars. In general, cultivar BR 4 presented significantly higher counts when compared to the tolerant cultivar (Embrapa 45), however it was not differentially expressed, reinforcing the possible differences in the response mechanisms targeted in each genotype when submitted to hypoxia condition. With respect to the abundance of counts, gma-miR166a-3p/b /c-3p/d/e/f/g/i-3p/n/o, gma-miR159a-3p/e-3p, gma-miR1507a and gma-miR1511 were the most abundant miRNAs in all four sRNA libraries (Supplementary Table S1).

To evaluate the expression profile, miRNAs were classified into two groups (G1 and G2) considering the counts observed in each studied condition. The G1 group was composed of gma-miRNAs that counted in all four conditions (BR4-C, BR4-H, E45-C and E45H) and G2 group was formed by the gma-miRNAs that had no counts in one or more sRNAs libraries, and in that group, the reads count was considered to determine miRNA expression profile. The G1 group contained 21 gma-miRNAs that were primarily negatively regulated in the tolerant cultivar Embrapa 45. In the sensitive cultivar BR 4, however, the counts of these gma-miRNAs, although high, did not differ

sufficiently between normoxia and hypoxia conditions to be characterized as a differential expression (Table 2). These data suggest that the level of regulation of gma-miRNA expression was less sensitive in BR 4 cultivar when compared to Embrapa 45 cultivar under hypoxia condition, hinting that in this cultivar, some specific genes are constantly silenced under normoxic conditions, but expressed during hypoxic environments, indicating a more efficient gene expression regulation mechanism. Likewise, in Embrapa 45 tolerant cultivar it was found that more than one member of the same miRNA family was similarly regulated (Tables 2 and 3), indicating that hypoxia may alter the expression of a specific subset of miRNAs. Still in the G1 group only the gma-miR408a-5p/c-5p was positively regulated in the two cultivars.

Table 2 Expression profile of gma-miRNAs that showed counts in soybean cultivars BR 4 and Embrapa 45 under conditions of normoxia and hypoxia (G1 group). The arrows ↓ and ↑ indicate, respectively, repression and induction of miRNA expression.

matures	miRNA_Acc.	log2 (BR4H/BR4C)		log2 (E45H/E45C)	
CAGGGGAACAGGCAGAGCAUG	gma-miR408a-5p/c-5p	2,29	↑	1,85	↑
UUCAAAUGUCAGAUUUAUAAA	gma-miR5374-3p	-0,20	--	-1,27	↓
UUAUCAAGGAAAUCACGGUCG	gma-miR1509a	0,29	--	-1,24	↓
UUGCCGAUUCACCCAUUCCU	gma-miR2118a-3p/b-3p	0,06	--	-1,25	↓
GGAGAUGGGAGGGUCGGUAAAAG	gma-miR2118a-5p/b-5p	-0,03	--	-1,01	↓
GGAAUGUUGUCUGGCUCGAGG	gma-miR166a-5p/c-5p/l	-0,57	--	-1,68	↓
UGUUGUUUUACCUAUUCCACC	gma-miR1510b-3p	-0,12	--	-1,17	↓
GAGGUGUUUGGGAUGAGAGAA	gma-miR1507c-5p	0,08	--	-1,31	↓
UCUCAUCCAUACAUCGUCUGA	gma-miR1507a	0,13	--	-1,27	↓
UUAUAGUCUGACAUCUGGAAU	gma-miR5374-5p	0,32	--	-1,30	↓
UUGUUCGAUAAAACUGUUGUG	gma-miR5372	0,44	--	-1,16	↓
AAGCUCAGGAGGGAUAGCGCC	gma-miR390a-5p/f/g	0,51	--	-1,13	↓
UAGAAAGGGAAAUAGCAGUUG	gma-miR1508c	0,38	--	-1,75	↓
AUGGGAUAAAUGUGAGCUCA	gma-miR1523a	0,45	--	-1,11	↓
CUGAAGUGUUUGGGGAACUC	gma-miR395a/b/c	0,36	--	-1,60	↓
UCUCCCCUACACCUCCAUACC	gma-miR482b-3p/d-3p	-0,52	--	-2,05	↓
UAUGGGGGGAUUGGGAAGGAA	gma-miR482e	-0,52	--	-1,20	↓
CGCUAUCCAUCUGAGUUUC	gma-miR390a-3p/c	-0,64	--	-1,90	↓
GUUCAAUAAAGCUGUGGGAAG	gma-miR396i-3p	-0,18	--	-1,75	↓
UCGAUAAACCUCUGCAUCCAG	gma-miR162b/c	0,22	--	-1,44	↓
GCGUAUGAGGAGCCAAGCAUA	gma-miR160a-3p	-0,92	--	-1,38	↓

MiR408 is highly conserved in plants and has been reported as responsive to light and copper, and in general, its target genes are copper-containing proteins. It has

also been reported that miR408 expression is significantly affected by a variety of developmental and environmental conditions; however, its biological function is unknown. Analysis of *Arabidopsis thaliana* transgenic plants with modulated expression of miR408 revealed that increased expression of miR408 resulted in improved tolerance to salinity, oxidative stress and cold but increased sensitivity to drought and osmotic stress (Ma et al. 2015). The presence of this positively regulated miRNA in both soybean cultivars, regardless of sensitivity or tolerance to hypoxia condition, suggests that miR408 may also be associated with gene silencing under hypoxic treatment in a non-genotype dependent manner, as a secondary response to oxidative stress caused by oxygen deficiency.

Generally, miRNAs are stress-induced and down-regulate their target mRNAs, however, their downregulation leads to the accumulation of their target genes playing a role of positive regulators (Chinnusamy et al., 2007). This down-regulated profile of miRNAs under hypoxia condition was also observed in *Populus tomentosa* in response to water stresses (drought and flood) (Ren et al., 2012). In these plants, significant changes in expression occurred in seven families of conserved miRNAs and in five new miRNAs identified in response to flood stress. Also in maize, the comparison of miRNA expression in roots revealed 32 miRNAs that responded to flooding, most of which negatively regulated (Zhai et al., 2013).

The gma-miR166a-5p/c-5p/l, which was also down regulated in the tolerant cultivar Embrapa 45, may be associated with root development. In *Medicago truncatula*, it was reported that the overexpression of miR166 in normal conditions resulted in a decrease in lateral root formation and changes in root vascular bundles. These authors reported that under hypoxia condition the expression of gma-miR166a-5p/c-5p/l family members was reduced (Boualem et al., 2008), as reported here to soybean, what could be a mechanism to increase root development under stress to increase root area to absorb O_2 .

In G2 group, 15 gma-miRNAs predominantly regulated in the sensitive cultivar BR 4 both positively and negatively in the hypoxia condition were gathered (Table 3). Among these gma-miRNAs, two members of miR156 family presented opposite counts profiles in relation to the genotype, in hypoxic condition, suggesting a possible differentiated regulation. This behavior was also observed between gma-miR319 and gma-miR171, but gma-miR319p and gma-miR171b-5p, according to miRBase, do not

belong to the same family as the other homologous members with the same nomenclature pattern.

In summary, an antagonistic behavior dependent on genotype tolerance to flooding can be identified, where one group of miRNAs acts as a indirect positive regulator in the tolerant cultivar, inducing the expression of its target genes (Table 2), and another group acts as a negative regulator in the sensitive cultivar, repressing their target genes expression (Table 3). Throughout evolution, plants have developed physiological and genetic mechanisms, as well as regulatory mechanisms to adapt to the environment; and in spite of sharing central genes that control plant response to various environmental factors, genotypes may exhibit differential gene expression due to deviations in growth conditions and selection of specific characteristics in cultivated crops (Zhang, 2015). Thus, as how happen in protein-encoding genes, many miRNAs under certain stress conditions also show varied expression depending on the species and also on the genotype, which is demonstrated by the profile and level of miRNA expression (Zhang, 2015).

Table 3 Expression profile of gma-miRNAs that showed counts in soybean cultivars BR 4 and Embrapa 45 under conditions of normoxia and hypoxia (G2 group). The arrows ↓ and ↑ indicate, respectively, repression and induction of miRNA expression.

matures	miRNA_Acc.	BR4-H	BR4-C	E45-H	E45-C
UUUUGGACUGAAGGGAGCUCC	gma-miR319p	0↓	226	115↑	0
UGGACUGAAGGGAGCUCCUUC	gma-miR319q	222↑	0	0↓	321
AGUGGAACUUUGAGGCCUGC	gma-miR5037c	313	464	0↓	492
GAGUUCCUCGACUCCAAGUC	gma-miR159b-5p/f-5p	0	0	0↓	122
ACGGGUCGCUCACCCUAGG	gma-miR4416a	1487	1419	0↓	1670
UUGACAGAAGAUAGAGAGCAC	gma-miR156c/d/e/i/j/l/m	0	0	0↓	1896
UGACAGAAGAGAGUGAGCAC	gma-miR156a/h/u/v/w/x/y	0	0	1470↓	3528
UGACAGAAGAGAGUGAGCAC	gma-miR156h/a/u/v/w/x/y	4364↑	0	0	0
UGACAGAAGAGAGUGAGCAC	gma-miR156a/h/u/v/x/w/y	0↓	2760	0	0
ACGGCGUGAUUUGGUACGGCUC	gma-miR171b-5p	0↓	101	54	80
UUGAGCCGCGCCAAUAUCACU	gma-miR171k-3p	265↑	0	0	0
UUGAGCCGCGUCAAUUCUUA	gma-miR171n/p	384↑	0	0	0
UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUA	gma-miR167a/b/d	442↑	0	0	0
UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUG	gma-miR167c/j	1906↑	0	0	0
UGUGUUCUCAGGUCACCCUU	gma-miR398a/b	1083↑	0	0	0
CAGCCAAGAAUGACUUGCCGG	gma-miR169k/l-5p	755↑	0	0	0

As discussed previously, miRNA responses to abiotic stress in a genotype - dependent manner as well as to specific environmental stress conditions was evidenced among several plant species and cultivars thought the analysis of miRNA expression levels under different abiotic conditions (Barrera-Figueroa et al., 2011; Fang et al., 2013; Yin et al., 2012; Ma et al., 2015).

3.3.5. Prediction of target genes of mature miRNAs identified in soybean under hypoxia

For the prediction of target genes only mature miRNA sequences from G1 and G2 groups previously described were considered. For the gma-miRNAs from G1 group, 434 potential genes were predicted to be positively regulated in the tolerant cultivar Embrapa 45. In G2 group, 190 target genes with regulatory potential were predicted, both positively and negatively (Supplementary Table S2).

The function of miRNAs can be mostly understood by the identification of their targets, which can be made *in silico*, by computational prediction of the targets. The same miRNA can potentially control the expression of hundreds of target-genes, but the effective target will depend on the condition that triggered plant responses, and therefore a manual and more focused check on possibilities that reflect responses to the condition of interest must be performed. According to Alptekin and co-workers (2017) to identify the most significant target-genes, the sum of unpaired energy (UPE) values and the expectation for all the targets of the same miRNA should be considered. As a result from this analysis, the target sequence with the smallest sum is considered to be the most enriched miRNA target.

In addition to the same miRNA potentially regulate the expression of different target genes; a single gene might also be regulated by more than one miRNA, through mechanisms of cleavage or translation. Of the predicted target genes approximately 80% showed mechanism of inhibition by cleavage (Supplementary Table S2). According to the literature, in plants, high complementarity between miRNAs and their target-mRNAs causes silencing predominantly by endonucleolytic cleavage (Vaucheret, 2015). However, when misalignment occurs around the center of the complementary region, which is usually essential for cleavage, translational repression may occur, leading to limited cleavage or to the destabilization of target-mRNAs (Brodersen et al., 2008). Thus, the mechanism by which the miRNA regulates the target-gene expression depends on the degree of complementarity between the seed region at the 5' end of the miRNA and the 3'-UTR region of the target miRNA, resulting in changes or not in the expression level of the target mRNA.

Translational repression induced by miRNAs is reversible and could be, in plants, an option to rapidly respond to temporary environmental stresses (Voinnet, 2009). Branco-Price and colleagues (2008) observed in *Arabidopsis thaliana* that hypoxia condition promoted a selective repression of translation, which was quickly reversed after re-oxygenation. During the treatment, more than half of the cellular mRNAs were restricted to polysomnical complexes, with little or no change in abundance (Branco-Price et al., 2008).

3.3.6. Functional categorization of miRNA target genes

Biological function of gma-miRNAs predicted targets-genes was determined by the classification of Gene Ontology (GO) categories. The category of biological processes with genes responsive to endogenous stimuli, chemicals and hormones was the most enriched in G1 group (Figure 4A), while in G2 group, the most enriched category contemplated genes with the binding biological functions (Figure 4B).

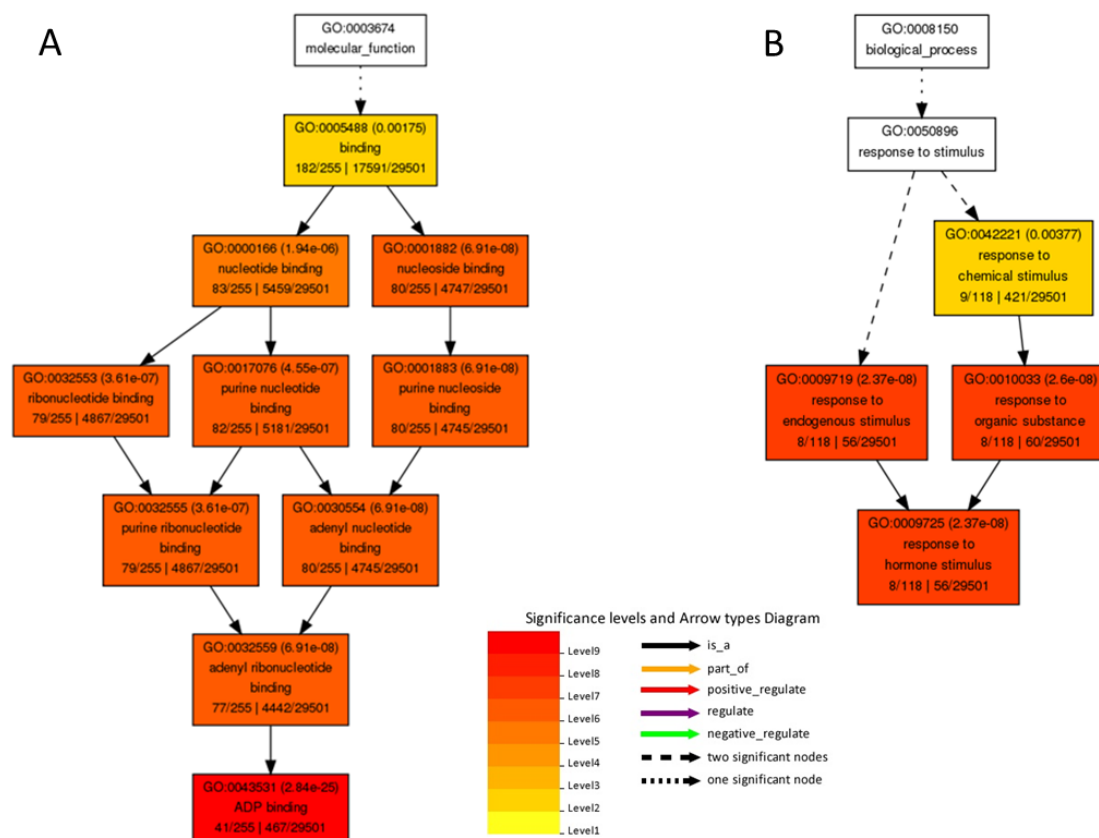


Figure 4 Functional categorization of miRNA targets. In A) Identification of the most enriched genetic ontology (GO) terms in the molecular function category of predicted target genes for gma-miRNAs from G1group. In B) Identification of the most enriched GO terms in the biological processes category of the predicted targets genes for gma-miRNA from G2group.

Among predicted target genes, different genes encoding transcription factors, such as MYB (myeloblatosis) GATA and DREB2A, genes from the transcription factor families SBP, NF-Y, ATHB, bHLH (basic helix-loop-helix) and TCP10 were identified as potentially induced in the tolerant cultivar Embrapa 45 and repressed in the sensitive cultivar BR 4. It is known that several transcription factors are involved in the regulation of molecular responses to oxygen deficiency. In *Arabidopsis* roots under hypoxic conditions it was observed that more than 180 genes of transcription factors

were regulated positively or negatively, most of which belonged to ERF (Ethylene Response Factor), bHLH, MYB, bZIP and Zinc Finger families (Licausi et al. 2011). The miRNAs, in turn, regulate post-transcriptional expression particularly of transcription factors (Li and Zhang, 2016), so plant responses to hypoxia conditions undergo cascade modulation, and thus to activate the molecular responses to hypoxia, seems likely a complex of transcriptional and pos-transcriptional regulators are acting. Therefore, the data obtained here suggest that the tolerant cultivar, in response to the O₂ restriction, can activate different mechanisms governed by FTs, potentiating their defenses and consequently tolerating this condition longer when compared to the sensitive soybean cultivar BR 4.

Several genes encoding proteins with leucine rich repeat (LRR) were predicted as targets for different miRNAs, such as gma-miR1507a, gma-miR1510b -3p, gma-miR319p, gma-miR171n/p. These genes were potentially induced indirectly in the tolerant cultivar Embrapa 45 and repressed or stable in susceptible cultivar BR 4. Leucine-rich repeating receptor (LRR) -like proteins represent an important class of cell surface receptor molecules that, in many biological processes, detect extracellular signals and modulate cell-to-cell communication (Wang et al., 2010). In this case, the data suggest that the tolerant cultivar Embrapa 45 would also present greater efficiency in the communication between cells and would respond more quickly and efficiently to stimuli such as oxygen deficiency.

Several genes encoding kinases protein and other proteins containing calcium binding domain and ion channel proteins were also predicted and potentially regulated positively in the tolerant cultivar Embrapa 45 and remained stable or were downregulated in sensitive cultivar BR 4. Among these genes, Glyma.14G023500, has been characterized as a calcium dependent protein kinase (CDPK). In plants, the CDPKs multigenic family is responsible for the perception of intracellular changes in Ca²⁺ concentration and translates this signal into specific events of phosphorylation to initiate new signaling processes. Therefore, CDPKs were characterized in plants predominantly in response to abiotic stress and signaling (Schulz et al., 2013) suggesting their involvement in the response to hypoxia in soybean.

Genes involved in respiration metabolism, in particular glycolysis and tricarboxylic acid cycle (TCA), were predicted as targets of gma-miR398a and potentially induced in the tolerant cultivar Embrapa 45. These genes encode key enzymes in glycolysis pathway such as pyruvate kinase (Glyma.02G071000 and

Glyma.16G152300) and in the TCA and electron carrier chain such as succinate dehydrogenase (Glyma.05G197400).

In plants, there are several isoforms of pyruvate kinase and this enzyme acts on the regulation and control of respiration. In normal conditions, pyruvate kinase is inhibited, however under energy deficit conditions as occurs during hypoxia, pyruvate kinase is activated and catalyzes the final reaction in the glycolysis pathway using ADP and phosphoenolpyruvate (PEP) to generate ATP and pyruvate (Plaxton Podesta et al., 2006). The TCA cycle is involved in the regulation of respiratory metabolism through enzymatic control, and also participates in the synthesis of intermediates such as isocitrate, malate and succinate. The TCA cycle also regulates the assimilation of CO₂ in the photosynthetic metabolism. Likewise, alternative pathways in TCA, such as GABA and the glyoxylate cycle, allow greater flexibility to adapt to environmental changes (Mustroph et al., 2018). The induction of genes involved in alternative pathways in the TCA cycle was previously observed in the analysis of differentially expressed transcripts in soybean cultivars Embrapa 45 and BR 4 under hypoxia condition, suggesting that the roots alter the oxidation of NADH to save ATP for the synthesis of glutamate under hypoxia (Nakayama et al., 2017).

Moreover, genes identified as malate dehydrogenases (MDH), (Glyma.03G014600 and Glyma.11G179200), were predicted as targets for regulation by gma-miR159b-5p and potentially induced in the tolerant cultivar Embrapa 45. In a flood tolerance experiment in *Brachiaria* species, it was found that the increase in ADH (alcohol dehydrogenase) and MDH activities plays a central role in the metabolic adaptation to flood stress (Ram, 2000). Considering that this gene would be induced in the tolerant cultivar, it can be suggested that Embrapa 45 has a more efficient control in the production of these alternative compounds in flood condition.

3.4. Conclusions

Results obtained here suggest that miRNAs act to regulate gene expression under hypoxia in a manner on O₂ deficiency condition and soybean genotype dependent. Data also showed the involvement of miRNAs in soybean roots response mechanisms, under both control and hypoxia conditions, but probably in different regulatory processes, since antagonistic miRNAs profiles were observed for the sensitive (BR 4) and tolerant (Embrapa 45) genotypes.

Some miRNAs identified in the control condition have been reported to regulate genes related to cell division, cell elongation and maintenance of the root apical meristem activity. Whereas, under hypoxic treatment, the identified miRNAs play a role as positive regulators acting on the regulation of transcription factors, genes sensitive to oxygen detection and involved in cell signaling, as well as, genes involved in metabolic processes that regulate the change of aerobic respiration to anaerobic fermentation, promoting energy adjustment in conditions of lack of O₂ through glycolysis and starch degradation.

The tolerant soybean cultivar Embrapa 45 presented a more efficient mechanism to perceive the oxygen deficiency and thus activate the complex network of vegetal response to hypoxia condition. In general, it is suggested that in this cultivar in the control condition, the gma-miRNAs act as negative regulators silencing genes of signaling and metabolism related to anaerobic respiration, but in the hypoxia condition, these miRNAs would act as positive regulators conferring greater plasticity in plant adaptation to hypoxia condition, by the regulation of key genes, such as FTs, kinases, LRR proteins and genes related to glycolysis and TCA, responsible for different metabolic processes of plant defense to O₂ restriction, thus conferring greater plant tolerance. Conclusively, our results suggest that miRNA-mediated gene regulation may contribute to the ability of soybean genotypes to respond to hypoxia differently.

3.5. Experimental procedures

3.5.1. Biological material

Soybean cultivars BR 4 and Embrapa 45, previously characterized respectively as sensitive and tolerant to flooding (Nakayama et al., 2017), were evaluated under two conditions of O₂ availability, normoxia (control) and hypoxia in three treatments times (30 min, 4h e 28h). The experiment was carried out in greenhouse conditions using a hydroponic system with Hoagland nutrition solution (Hoagland and Arnon, 1950), as described by Nakayama and co-workers (2017). Greenhouse conditions were temperature of 30 ± 4°C and relative humidity of 68 ± 8%.

The experimental design followed factorial scheme with 02 soybean cultivars x 02 conditions with different O₂ availability (normoxia and hypoxia) x 03 treatments sampling times (30min, 4h e 28h), with three blocks, each one containing 4 biological replicates. Temperature and O₂ level in the plastic boxes were monitored using a

portable oxymeter (HI 9146, Hanna). Hypoxic conditions were induced by N₂ injection and considered when O₂ concentration reached $\leq 2\text{mg.L}^{-1}$. Roots were collected from both soybean cultivars in each treatment sampling times, placed in liquid nitrogen, and stored in ultra freezer until total RNA extraction.

3.5.2. Validation of hypoxia conditions using RTqPCR

The oxygen deficiency treatment applied in soybean cultivars BR 4 and Embrapa 45 was validated through RTqPCR of the enzyme alcohol dehydrogenase (ADH) (EC1.1.1.1 - Glyma.04G240800.1) (ADH-F 5'CCTGTGAGGGACTGAGTTCTCTTTC3', ADH-R 5'ACAGCAGCAAAGGTCCTATCATTCT3').

Total RNA was extracted from root tissues using Trizol[®] reagent (Invitrogen), and 1 μg total RNA was treated with DNase I, Amplification Grade (Invitrogen). After the RNA was reverse transcribed into cDNA using SuperScript[™] III First-Strand Synthesis System (Invitrogen). All processes were carried out according to manufacturer instructions.

Amplification were performed in a 7900 Real Time Systems thermocycler (Applied Biosystems) using Platinum[®] SYBR Green[®] qPCR Super Mix-UDG with ROX (Invitrogen), according to manufacture's instructions. Cycling conditions used were 50°C for 2 min; 95°C for 10 min; followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 1 min, 5°C for 15s, 60°C for 15s and finally 95°C for 15s.

The relative gene expression was determined by normalization with the mean of threshold cycles (Ct) of the reference genes Elongation Factor 1B (ELF1B) (Glyma.02G276600) (ELF1B-F 5'AAACGGCTACCACATCCAAGG3', ELF1B-R 5' CCTTCAATGGATCCATCGTTA3') and β -actin (Glyma.15G050200) (5'GAGCTATGAATTGCCTGATGG3', 5' CGTTTCATGAATTCCAGTAGC3') previously identified as more stable for soybean flooding condition (Nakayama et al., 2014). Expression was calculated by the $E^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

3.5.3. RNA libraries construction and sequencing

Small RNAs (sRNAs) libraries were generated from roots samples of soybean cultivars Embrapa 45 and BR 4, in two treatment conditions (normoxia and hypoxia) and one time (Bulk of the 03 treatments sampling times = 30min, 4h and 28h). Total

RNA was obtained from root samples using the Trizol[®] reagent. To obtain the sRNA libraries, Chrysalis 36cycles v 4.0 kit (Illumina) was used. Sequencing was carried out in an instrument *EAS210* version “GA-IIx” by Fasteris SA (Switzerland).

3.5.4. Data Analysis Pipeline

The sequencing data analysis was carried out in pipeline *RTA SCS.2.6, GERALD.1.5.1* by Fasteris. The sample sequences were attributed according to their index code (6 bases). Samples were first attributed for perfect matches and then with up to 2 mismatches allowed, unless it can then be attributed to 2 samples. Therefore, the data set provided conted only sequences attributed without ambiguity to only one sample.

The 3' adapter sequences (CTGTAGGCACCATCAATCGTA) were trimmed from the raw reads in 3 steps. The full adapter sequence was used, which permitted to identify “inserts” of 12 nt or less. If no adapter sequence was found, in successive steps the last base of the adapter was removed and the sequence was searched at the end of the reads. The minimum adapter sizes of 8 bases permitted identify inserts of up to 30 bases. Finally the remaining reads were search for not-exact matches of the adapter. The first 5 bases of the adapter were searched within the full reads sequences and at least 80% of the following bases must be identical to the adapter sequence (max 32 bp). After trimming of the adapter sequences, the inserts were sorted in separate files according to their lengths.

3.5.5. Identification of miRNAs target genes

The quantification of expressed miRNAs in the sRNA libraries data was performed using miRDeep program (Mackowiak, 2011), considering the pre-set parameters (default) in the analysis. The miRNAs containing the same mature sequence were pooled and considered as isomiRs. miRDeep results were analyzed separately according to the mature miRNAs families and according to the overall alignment using Clustal X2.1. The miRNAs were named based on similarity to soybean sequences and their orthologs described in the miRBase database (<http://www.mirbase.org>).

Other known non-coding RNAs, such as rRNAs, tRNAs and snoRNAs were removed by comparing the unique reads aligned in the reference genome against the Rfam database.

A search was carried out for the target genes of the mature miRNAs using the online tool psRNATarget (Dai et al., 2018) (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/analysis>). The input data were mature miRNAs in soybean and target genes were predicted using Phytozome database (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>).

To check shared and exclusive miRNAs and target genes in all libraries Venn diagrams were made using the Venny online tool (Oliveros, 2007) (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

3.5.6. miRNAs differential expression

To identify the gma-miRNAs differentially expressed in hypoxia condition, only miRNAs with counts above 100 were considered. These gma-miRNAs were divided into two groups (G1 and G2). The G1 group gathered the gma-miRNAs that showed counts in all four conditions: cultivar-sensitive BR 4 under normoxia and hypoxia and cultivar-tolerant Embrapa 45 under normoxia and hypoxia treatments. The differential expression was calculated considering the log₂ ratio between treatment (hypoxia) and control (normoxia). In the G2 group, were assembled the gma-miRNAs that did not present counts in one or more than one studied conditions, and therefore it was not possible to calculate the differential expression. Thus, to evaluate the regulation profile of the target gene regulated by these miRNAs the count of reads was considered.

3.5.7. Enrichment analysis of miRNA target genes

Transcripts identified as targets of the miRNAs were submitted to an enrichment analysis using the AgriGO database (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/analysis.php>). These transcripts were associated with their respective GOs (Plant GO slim) terms and compared with the terms observed in the soybean genome using Fisher's test and Hochberg's correction (FDR) ($p = 0.05$). The relative percentage of transcripts was calculated by the ratio of the number of genes mapped in each GO term and the number of genes observed in the reference genome for each class.

3.6. References

- Ahmed, F., Rafii, M. Y., Ismail, M. R., Juraimi, A. S., Rahim, H. A., Asfaliza, R., & Latif, M. A. (2012). Waterlogging tolerance of crops: breeding, mechanism of tolerance, molecular approaches, and future prospects. *BioMed Research International*, 2013.
- Ali, S., Liu, Y., Ishaq, M., Shah, T., Ilyas, A., & Din, I. U. (2017). Climate change and its impact on the yield of major food crops: Evidence from Pakistan. *Foods*, 6(6), 39.
- Alptekin, B., Akpinar, B. A., & Budak, H. (2017). A comprehensive prescription for plant miRNA identification. *Frontiers in plant science*, 7, 2058.
- Bailey-Serres, J., & Voeselek, L. A. C. J. (2008). Flooding stress: acclimations and genetic diversity. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 313-339.
- Barrera-Figueroa, B. E., Gao, L., Diop, N. N., Wu, Z., Ehlers, J. D., Roberts, P. A., ... & Liu, R. (2011). Identification and comparative analysis of drought-associated microRNAs in two cowpea genotypes. *BMC plant biology*, 11(1), 127.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*, 116(2), 281-297.
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *cell*, 136(2), 215-233.
- Borges, F., & Martienssen, R. A. (2015). The expanding world of small RNAs in plants. *Nature reviews Molecular cell biology*, 16(12), 727.
- Boualem, A., Laporte, P., Jovanovic, M., Laffont, C., Plet, J., Combier, J. P., ... & Frugier, F. (2008). MicroRNA166 controls root and nodule development in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*, 54(5), 876-887.
- Branco-Price, C., Kaiser, K. A., Jang, C. J., Larive, C. K., & Bailey-Serres, J. (2008). Selective mRNA translation coordinates energetic and metabolic adjustments to cellular oxygen deprivation and reoxygenation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 56(5), 743-755.

Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y. Y., Sieburth, L., & Voinnet, O. (2008). Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*, 320(5880), 1185-1190.

Chinnusamy, V., Zhu, J., Zhou, T., & Zhu, J. K. (2007). Small RNAs: big role in abiotic stress tolerance of plants. In *Advances in Molecular Breeding toward Drought and Salt Tolerant Crops* (pp. 223-260). Springer, Dordrecht.

Chu, C. Y., & Rana, T. M. (2007). Small RNAs: regulators and guardians of the genome. *Journal of cellular physiology*, 213(2), 412-419.

Dai, X., Zhuang, Z., & Zhao, P. X. (2018). psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic acids research*.

Deshmukh, R., Sonah, H., Patil, G., Chen, W., Prince, S., Mutava, R., Vuong, T., Valliyodan, B., Nguyen, H. T. (2014). Integrating omic approaches for abiotic stress tolerance in soybean. *Frontiers in Plant science*, 5, 244.

Ebrahimi Khaksefidi, R., Mirlohi, S., Khalaji, F., Fakhari, Z., Shiran, B., Fallahi, H., ... & Ebrahimie, E. (2015). Differential expression of seven conserved microRNAs in response to abiotic stress and their regulatory network in *Helianthus annuus*. *Frontiers in plant science*, 6, 741.

Fang, X., Zhao, Y., Ma, Q., Huang, Y., Wang, P., Zhang, J., ... & Yang, C. (2013). Identification and comparative analysis of cadmium tolerance-associated miRNAs and their targets in two soybean genotypes. *PLoS One*, 8(12), e81471.

Fornara, F., & Coupland, G. (2009). Plant phase transitions make a SPLash. *Cell*, 138(4), 625-627.

Guo, N., Ye, W. W., Wu, X. L., Shen, D. Y., Wang, Y. C., Xing, H., & Dou, D. L. (2011). Microarray profiling reveals microRNAs involving soybean resistance to *Phytophthora sojae*. *Genome*, 54(11), 954-958.

Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California agricultural experiment station*, 347(2nd edit).

Huang, W., Peng, S., Xian, Z., Lin, D., Hu, G., Yang, L., ... & Li, Z. (2017). Overexpression of a tomato miR171 target gene Sl GRAS 24 impacts multiple agronomical traits via regulating gibberellin and auxin homeostasis. *Plant biotechnology journal*, 15(4), 472-488.

Hwang, E. W., Shin, S. J., Yu, B. K., Byun, M. O., & Kwon, H. B. (2011). miR171 family members are involved in drought response in *Solanum tuberosum*. *Journal of Plant Biology*, 54(1), 43-48.

Jia, X., Wang, W. X., Ren, L., Chen, Q. J., Mendu, V., Willcut, B., ... & Tang, G. (2009). Differential and dynamic regulation of miR398 in response to ABA and salt stress in *Populus tremula* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, 71(1-2), 51-59.

Jin, Q., Xu, Y., Mattson, N., Li, X., Wang, B., Zhang, X., ... & Yao, D. (2017). Identification of submergence-responsive microRNAs and their targets reveals complex miRNA-mediated regulatory networks in lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn). *Frontiers in plant science*, 8, 6.

Kato-Noguchi, H., & Morokuma, M. (2007). Ethanolic fermentation and anoxia tolerance in four rice cultivars. *Journal of plant physiology*, 164(2), 168-173.

Komatsu, S., Thibaut, D., Hiraga, S., Kato, M., Chiba, M., Hashiguchi, A., . & Yasue, H. (2011). Characterization of a novel flooding stress-responsive alcohol dehydrogenase expressed in soybean roots. *Plant molecular biology*, 77(3), 309-322.

Komatsu, S., Yamamoto, R., Nanjo, Y., Mikami, Y., Yunokawa, H., & Sakata, K. (2009). A comprehensive analysis of the soybean genes and proteins expressed under flooding stress using transcriptome and proteome techniques. *Journal of Proteome Research*, 8(10), 4766-4778.

Kulcheski, F. R., de Oliveira, L. F., Molina, L. G., Almerão, M. P., Rodrigues, F. A., Marcolino, J., ... & Abdelnoor, R. V. (2011). Identification of novel soybean microRNAs involved in abiotic and biotic stresses. *BMC genomics*, 12(1), 307.

Lee, T., Tran, A., Hansen, J., & Ash, M. (2016). Major factors affecting global Soybean and products trade projections. *Amber Waves*, (04).

- Li, H., Dong, Y., Yin, H., Wang, N., Yang, J., Liu, X., ... & Li, X. (2011). Characterization of the stress associated microRNAs in *Glycine max* by deep sequencing. *BMC plant biology*, 11(1), 170.
- Li, S. B., Xie, Z. Z., Hu, C. G., & Zhang, J. Z. (2016). A review of auxin response factors (ARFs) in plants. *Frontiers in plant science*, 7, 47.
- Li, W. X., Oono, Y., Zhu, J., He, X. J., Wu, J. M., Iida, K., ... & Zhu, J. K. (2008). The *Arabidopsis* NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. *The Plant Cell*, 20(8), 2238-2251.
- Li, X., Wang, X., Zhang, S., Liu, D., Duan, Y., & Dong, W. (2012). Identification of soybean microRNAs involved in soybean cyst nematode infection by deep sequencing. *PloS one*, 7(6), e39650.
- Licausi, F., Weits, D. A., Pant, B. D., Scheible, W. R., Geigenberger, P., & van Dongen, J. T. (2011). Hypoxia responsive gene expression is mediated by various subsets of transcription factors and miRNAs that are determined by the actual oxygen availability. *New phytologist*, 190(2), 442-456.
- Liu, P., Sun, F., Gao, R., & Dong, H. (2012). RAP2. 6L overexpression delays waterlogging induced premature senescence by increasing stomatal closure more than antioxidant enzyme activity. *Plant molecular biology*, 79(6), 609-622.
- Liu, T., Fang, C., Ma, Y., Shen, Y., Li, C., Li, Q., ... & Yang, R. (2016). Global investigation of the co-evolution of MIRNA genes and micro RNA targets during soybean domestication. *The Plant Journal*, 85(3), 396-409.
- Ma, C., Burd, S., & Lers, A. (2015). mi R 408 is involved in abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 84(1), 169-187.
- Ma, Z., Hu, X., Cai, W., Huang, W., Zhou, X., Luo, Q., ... & Huang, J. (2014). *Arabidopsis* miR171-targeted scarecrow-like proteins bind to GT cis-elements and mediate gibberellin-regulated chlorophyll biosynthesis under light conditions. *PLoS genetics*, 10(8), e1004519.

- Moldovan, D., Spriggs, A., Yang, J., Pogson, B. J., Dennis, E. S., & Wilson, I. W. (2009). Hypoxia-responsive microRNAs and trans-acting small interfering RNAs in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*, 61(1), 165-177.
- Mustroph, A. (2018). Improving flooding tolerance of crop plants. *Agronomy*, 8(9), 160.
- Nakayama, T. J., Rodrigues, F. A., Neumaier, N., Marcelino-Guimarães, F. C., Farias, J. R., De Oliveira, M. C., ... & Nepomuceno, A. L. (2014). Reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction studies in soybean plants under hypoxic conditions. *Genet Mol Res*, 13, 860-871.
- Nakayama, T. J., Rodrigues, F. A., Neumaier, N., Marcolino-Gomes, J., Molinari, H. B., Santiago, T. R., ... & de Oliveira, A. C. (2017). Insights into soybean transcriptome reconfiguration under hypoxic stress: Functional, regulatory, structural, and compositional characterization. *PloS one*, 12(11), e0187920.
- Nozawa, M., Miura, S., & Nei, M. (2012). Origins and evolution of microRNA genes in plant species. *Genome biology and evolution*, 4(3), 230-239.
- Oliveros, J. C. (2007). VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.
- Pinto, L.F.S.; Gomes, A.S.; Neto, L.A.J.; Pauletto, E.A. (2006). Solos cultivados com Arroz Irrigado na Região Subtropical: RS e SC. In: Magalhães JR., A. M; Gomes, A. da S.; Santos, A. B. (Ed.) Sistema de Cultivo de Arroz Irrigado no Brasil. Pelotas, RS: Embrapa Clima Temperado, p. 59-72,.
- Plaxton, W. C., & Podestá, F. E. (2006). The functional organization and control of plant respiration. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25(2), 159-198.
- Ram, S. (2000). Role of alcohol dehydrogenase, malate dehydrogenase and malic enzyme in flooding tolerance in *Brachiaria* species. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 9(1), 45-47.

Ren, Y., Chen, L., Zhang, Y., Kang, X., Zhang, Z., & Wang, Y. (2012). Identification of novel and conserved *Populus tomentosa* microRNA as components of a response to water stress. *Functional & integrative genomics*, 12(2), 327-339.

Schulz, P., Herde, M., & Romeis, T. (2013). Calcium-dependent protein kinases: hubs in plant stress signaling and development. *Plant physiology*, pp-113.

Sharma, P. C., Kumar, A., & Vineeth, T. V. (2017). Current Trends in Salinity and Waterlogging Tolerance. In *Abiotic Stress Management for Resilient Agriculture* (pp. 177-220). Springer, Singapore.

Starega-Roslan, J., Krol, J., Koscianska, E., Kozlowski, P., Szlachcic, W. J., Sobczak, K., & Krzyzosiak, W. J. (2010). Structural basis of microRNA length variety. *Nucleic acids research*, 39(1), 257-268.

Sunkar, R., Kapoor, A., & Zhu, J. K. (2006). Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *The Plant Cell*, 18(8), 2051-2065.

Sunkar, R., Li, YF e Jagadeeswaran, G. (2012). Funções dos microRNAs nas respostas ao estresse das plantas. *Trends Plant Sci* . 17, 196-203. doi: 10.1016 / j.tplants.2012.01.010

Taylor, R. S., Tarver, J. E., Hiscock, S. J., & Donoghue, P. C. (2014). Evolutionary history of plant microRNAs. *Trends in Plant Science*, 19(3), 175-182.

Tian, B., Wang, S., Todd, T. C., Johnson, C. D., Tang, G., & Trick, H. N. (2017). Genome-wide identification of soybean microRNA responsive to soybean cyst nematodes infection by deep sequencing. *BMC genomics*, 18(1), 572.

Vaucheret, H. (2015). Gene silencing: Mode of miRNA biogenesis matters. *Nature plants*, 1(3), 15019.

Wang, G., Fiers, M., Ellendorff, U., Wang, Z., de Wit, P. J., Angenent, G. C., & Thomma, B. P. (2010). The diverse roles of extracellular leucine-rich repeat-containing receptor-like proteins in plants. *Critical Reviews in Plant Science*, 29(5), 285-299.

- Wang, Y., Zhang, C., Hao, Q., Sha, A., Zhou, R., Zhou, X., & Yuan, L. (2013). Elucidation of miRNAs-mediated responses to low nitrogen stress by deep sequencing of two soybean genotypes. *PLoS One*, 8(7), e67423.
- Wong, J., Gao, L., Yang, Y., Zhai, J., Arikkit, S., Yu, Y., ... & Li, S. (2014). Roles of small RNAs in soybean defense against *Phytophthora sojae* infection. *The Plant Journal*, 79(6), 928-940.
- Yan, Z., Hossain, M. S., Arikkit, S., Valdés-López, O., Zhai, J., Wang, J., ... & Stacey, G. (2015). Identification of microRNAs and their mRNA targets during soybean nodule development: functional analysis of the role of miR393j-3p in soybean nodulation. *New Phytologist*, 207(3), 748-759.
- Yan, Z., Hossain, M. S., Valdés-López, O., Hoang, N. T., Zhai, J., Wang, J., ... & Qiu, L. (2016). Identification and functional characterization of soybean root hair microRNAs expressed in response to *B. radycyathium japonicum* infection. *Plant biotechnology journal*, 14(1), 332-341.
- Yin, Z., Li, Y., Yu, J., Liu, Y., Li, C., Han, X., & Shen, F. (2012). Difference in miRNA expression profiles between two cotton cultivars with distinct salt sensitivity. *Molecular biology reports*, 39(4), 4961-4970.
- Zeng, Q. Y., Yang, C. Y., Ma, Q. B., Li, X. P., Dong, W. W., & Nian, H. (2012). Identification of wild soybean miRNAs and their target genes responsive to aluminum stress. *BMC plant biology*, 12(1), 182.
- Zhai, L., Liu, Z., Zou, X., Jiang, Y., Qiu, F., Zheng, Y., & Zhang, Z. (2013). Genome-wide identification and analysis of microRNA responding to long-term waterlogging in crown roots of maize seedlings. *Physiologia plantarum*, 147(2), 181-193.
- Zhao, B., Ge, L., Liang, R., Li, W., Ruan, K., Lin, H., & Jin, Y. (2009). Members of miR-169 family are induced by high salinity and transiently inhibit the NF-YA transcription factor. *BMC molecular biology*, 10(1), 29.
- Zhou, X., Wang, G., & Zhang, W. (2007). UV-B responsive microRNA genes in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular systems biology*, 3(1), 103.

Zhou, ZS, Song, JB e Yang, ZM (2012). Identificação do genoma de microRNAs de *Brassica napus* e seus alvos em resposta ao cádmio. *J. Exp. Bot.* 63, 4597-4613. doi: 10.1093/jxb/e

3.7. Material Complementar

3.7.1 Supplementary Table – S1

mature sequence	miRNA_Acc.	BR4-H	BR4-C	E45-H	E45-C	Chromossome	Start	Stop	Strand	Family	Status
UCGGACCAGGCUUCAUCCCC	gma-miR166a-3p/b/c-3p/d/e/f/g/i-3p/n/o	121587	128375	62883	104861	chr16	1934911	1935056	-	MIPF0000004	conserved
UCUCAUCCAACAUCGUCUGA	gma-miR1507a	42955	39309	18957	45724	chr13	27036567	27036673	+	MIPF0000699	conserved
GAGGUGUUUGGAUGAGAGAA	gma-miR1507c-5p	380	360	134	332	chr9	17134380	17134469	-	--	conserved
UAGAAAGGGAAAUAGCAGUUG	gma-miR1508c	165	127	50	168	chr9	31140427	31140516	+	MIPF0000719	conserved
UUAUAACAAGGAAAUCACGGUCG	gma-miR1509a	8335	6816	2809	6614	chr17	9813056	9813166	+	MIPF0000771	conserved
UGUUGUUUUACCUAUUCCACC	gma-miR1510b-3p	1118	1219	635	1425	chr16	31887382	31887474	+	MIPF0000703	conserved
AGGGAUAGGUAACAACUACU	gma-miR1510b-5p	8878	9245	5145	9191	chr16	31887382	31887474	-	MIPF0000703	conserved
AACCAGGCUCUGAUACCAUG	gma-miR1511	45662	32685	34203	45855	chr18	20910835	20910933	+	--	Soy-specific
UAACUGGAAAUUCUAAAGCAU	gma-miR1512b	56	48	22	68	chr2	8707970	8708058	-	MIPF0001291	Soy-specific
UGAGAGAAAGCCAUGACUUAC	gma-miR1513a-5p/b	62	62	31	80	chr7	43192197	43192289	+	MIPF0001360	Soy-specific
UUCAUUUUUAAAAUAGGCAUU	gma-miR1514a-5p	14	12	0	14	chr7	43120760	43120858	-	MIPF0000694	Soy-specific
UCAUUUUGCGUGCAAUGAUCUG	gma-miR1515a/b	369	376	215	361	chr1	49411416	49411560	+	MIPF0001591	Soy-specific
AGUCUUGGUCAAUGUCGUUCGAA	gma-miR1517	10	0	0	10	chr14	43676665	43677061	+	--	Soy-specific
UAAGUGUUGCAAAUAGUCAUU	gma-miR1519	12	16	17	14	chr7	11379900	11380166	+	--	Soy-specific
AAUCAGAACAUGACACGUGAUA	gma-miR1520l	17	0	10	0	chr18	51411526	51411635	+	MIPF0000581	Soy-specific
AUUGACCAAUCAGAACAUGACA	gma-miR1520q	0	20	0	22	chr8	13091468	13091583	-	MIPF0000581	Soy-specific
AUGGGAUAAAUGUGAGCUCA	gma-miR1523a	162	119	73	158	chr2	12591029	12591123	-	MIPF0001327	Soy-specific
AUAUGGACGAAGAGAUAGGUAA	gma-miR1531-5p	56	49	0	19	chr20	41470544	41470658	+	--	Soy-specific

CUUGUUUGUGGUGAUGUCUAG	gma-miR1535b	132	155	131	162	chr19	43989927	43990016	-	--	Soy-specific
UGACAGAAGAGAGUGAGCAC	gma-miR156a/h/u/v/w/x/y	0	0	1470	3528	chr17	5885507	5885628	-	MIPF0000008	conserved
UGACAGAAGAGAGUGAGCAC	gma-miR156a/h/u/v/x/w/y	0	2760	0	0	--	--	--	--	MIPF0000008	conserved
UUGACAGAAGAUAGAGAGCAC	gma-miR156c/d/e/i/j/l/m	0	0	0	1896	chr16	5359989	5360173	-	MIPF0000008	conserved
UGACAGAAGAGAGUGAGCAC	gma-miR156h/a/u/v/w/x/y	4364	0	0	0	chr4	5047205	5047294	-	MIPF0000008	conserved
UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA	gma-miR159a-3p/e-3p	59084	59906	37644	56136	chr9	40266722	40266935	+	MIPF0000010	conserved
GAGCUCCUUGAAGUCCAAUUG	gma-miR159a-5p	137	162	81	147	chr9	40266722	40266935	-	MIPF0000010	conserved
GAGUUCCCUGCACUCCAAGUC	gma-miR159b-5p/f-5p	0	0	0	122	chr7	5424789	5424974	-	MIPF0000010	conserved
GCGUAUGAGGAGCCAAGCAUA	gma-miR160a-3p	59	112	10	26	chr10	44431708	44431826	+	MIPF0000032	conserved
UGCCUGGCUCCCUGUAUGCCA	gma-miR160a-5p/f	199	277	107	210	chr10	4750208	4750304	-	MIPF0000032	conserved
UCGAUAAACCUCUGCAUCCAG	gma-miR162b/c	588	504	239	649	chr5	1431946	1432055	+	MIPF0000127	conserved
UGGAGAAGCAGGGCACGUGCA	gma-miR164a/e/f/g/h/i/j/k	439	568	353	507	chr19	49681250	49681344	+	MIPF0000045	conserved
GGAAUGUUGUCUGGCUCGAGG	gma-miR166a-5p/c-5p/l	2084	3096	847	2705	chr16	1934911	1935056	-	MIPF0000004	conserved
GGAAUGUUGUUUGGCUCGAGG	gma-miR166h-5p/j-5p	74	0	0	0	chr8	14920990	14921179	+	MIPF0000004	conserved
UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUA	gma-miR167a/b/d	442	0	0	0	chr19	42073549	42073667	+	MIPF0000023	conserved
UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUG	gma-miR167c/j	1906	0	0	0	chr7	39734580	39734954	+	MIPF0000023	conserved
UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUU	gma-miR167e/f	3185	2648	2211	2871	chr20	39002092	39002200	+	MIPF0000023	conserved

UCGCUUGGUGCAGGUCGGGAA	gma-miR168a	25516	29570	13126	20094	chr9	44068673	44068797	-	MIPF0000081	conserved
CAGCCAAGGAUGACUUGCCGG	gma-miR169a/f/g/m	1012	828	553	607	chr9	38336014	38336134	+	MIPF0000037	conserved
UUUCGACGAGUUGUUCUUGGC	gma-miR169j-3p	42	45	33	37	chr2	43801693	43801777	+	MIPF0000037	conserved
CAGCCAAGAAUGACUUGCCGG	gma-miR169k/l-5p	755	0	0	0	chr9	5312564	5312668	+	MIPF0000037	conserved
ACGGCGUGAUAUUGGUACGGCU C	gma-miR171b-5p	0	101	54	80	chr4	50115835	50115926	-	MIPF0000104	conserved
UUGAGCCGCGCCAAUAUCACU	gma-miR171k-3p	265	0	0	0	chr13	27458231	27458328	+	MIPF0000030	conserved
UUGAGCCGCGUCAAAUAUCUCA	gma-miR171m/t	854	650	426	633	chr12	8432426	8432558	+	MIPF0000030	conserved
UUGAGCCGCGUCAAAUAUCUUA	gma-miR171n/p	384	0	0	0	chr12	35463985	35464118	+	MIPF0000030	conserved
AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAU	gma-miR172a/b-3p/h- 3p	11	15	0	10	chr12	6139598	6139756	-	MIPF0000035	conserved
GUAGCAUCAUCAAGAUUCAC	gma-miR172b-5p	31	0	17	0	chr13	41847312	41847464	-	MIPF0000035	conserved
GCAGCACCAUCAAGAUUCAC	gma-miR172g	0	11	0	0	chr10	31996846	31996959	-	MIPF0000035	conserved
GCAGCAGCAUCAAGAUUCACA	gma-miR172h-5p	0	0	0	10	chr10	44054389	44054479	-	MIPF0000035	conserved
CAAACCUCCGUAGCCUGUAUC	gma-miR2107	11	0	0	11	--	--	--	--		Soy- specific
GGAGGCGUAGAUACUCACACC	gma-miR2109-3p	502	700	412	650	chr4	36995886	36995956	+	MIPF0001000	conserved
UGCGAGUGUCUUCGCCUCUG	gma-miR2109-5p	445	753	481	484	chr4	36995886	36995956	-	MIPF0001000	conserved
UAAUCUGCAUCCUGAGGUUUA	gma-miR2111b/c/e/f	32	22	20	18	chr18	45662001	45662084	-	MIPF0000754	conserved
UUGCCGAUUCCACCCAUCCU	gma-miR2118a-3p/b-3p	3797	3644	2169	5170	chr20	36443544	36443713	+	MIPF0000745	conserved
GGAGAUGGGAGGGUCGGUAAAAG	gma-miR2118a-5p/b-5p	2816	2866	1458	2929	chr10	49169712	49169821	-	MIPF0000403	conserved
UCAAGGGAGUUGUAGGGGAA	gma-miR2119	1632	1494	825	984	chr1	7214478	7214613	-	MIPF0000762	conserved
AAAAGCACUUAAGGAACGGUA	gma-miR2606a/b	11	0	10	13	chr20	34012454	34012637	+	MIPF0000888	conserved
UUUUGGACUGAAGGGAGCUCC	gma-miR319p	0	226	115	0	chr6	22789766	22789844	+	MIPF0001104	conserved
UGGACUGAAGGGAGCUCCUUC	gma-miR319q	222	0	0	321	--	--	--	--	MIPF0000010	conserved
AGACCAAUGAGCAGCUGA	gma-miR3522	4055	3216	1700	2639	chr15	4337688	4337774	+	MIPF0000936	conserved
CGCUAUCCAUCCUGAGUUUC	gma-miR390a-3p/c	41	64	37	138	chr3	6398854	6398958	+	MIPF0000101	conserved

AAGCUCAGGAGGGAUAGCGCC	gma-miR390a-5p/f/g	232	163	123	270	chr3	6398854	6398958	-	MIPF0000101	conserved
AUCAUGCUAUCCCUUUGGAUU	gma-miR393c-3p	35	53	23	43	chr2	44047954	44048066	+	MIPF0000083	conserved
UUCCAAAGGGAUCGCAUUGAUC	gma-miR393h/i/j/k	0	56	25	58	chr9	34250214	34250360	+	MIPF0000083	conserved
UUGGCAUUCUGUCCACCUC	gma-miR394a-5p	0	11	0	0	chr17	41517111	41517267	-	MIPF0000100	conserved
CUGAAGUGUUUGGGGGAACUC	gma-miR395a/b/c	145	113	26	79	chr1	4840520	4840629	+	MIPF0000016	conserved
UUCCACAGCUUUCUUGAACUU	gma-miR396b-5p/c/k-5p	7799	9196	5074	7755	chr13	27517027	27517152	-	MIPF0000047	conserved
GUUCAAUAAAGCUGUGGGAAG	gma-miR396i-3p	11120	12599	3607	12108	chr17	8774041	8774175	+	MIPF0000047	conserved
UCAUUGAGUGCAGCGUUGAUG	gma-miR397a/b-5p	737	543	416	478	chr8	4644313	4644420	-	MIPF0000120	conserved
UAUUGACGCUGCACUCAAUCA	gma-miR397b-3p	12	0	0	0	chr13	35595158	35595279	+	MIPF0000120	conserved
UGUGUUCUCAGGUCACCCCUU	gma-miR398a/b	1083	0	0	0	chr1	7214749	7214864	-	MIPF0000107	conserved
UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	gma-miR398c/d	1369	913	765	488	chr8	14229061	14229170	-	MIPF0000107	conserved
UUAGAUUCACGCACAAACUUG	gma-miR403a/b	22	13	0	10	chr2	1041992	1042080	+	MIPF0000290	conserved
AUGCACUGCCUCUCCUGGC	gma-miR408a-3p/b-3p/c-3p	1654	1008	626	878	chr2	837414	837546	+	MIPF0000102	conserved
CAGGGGAACAGGCAGAGCAUG	gma-miR408a-5p/c-5p	191	39	47	13	chr2	837414	837546	-	MIPF0000102	conserved
UAAGACGGAACUUACAAAGAUU	gma-miR4345	34	31	17	30	chr14	48700139	48700232	-	--	Soy-specific
GAAAGACCAAACGAGAAGCUGC AU	gma-miR4346	11	0	0	11	--	--	--	--	--	Soy-specific
AUUGGGAUUCAGUUGGAGUUGG	gma-miR4351	21	19	27	24	--	--	--	--	--	Soy-specific
AUUUCUAGGACAUACUACGACG GU	gma-miR4352a	0	0	0	12	chr10	24453395	24453530	+	--	Soy-specific
CUGAACCCUAGCGAAGUAAAUC	gma-miR4367	12	0	0	0	chr1	2417160	2417384	+	--	Soy-specific
AGUAGACUCGUCCGAUUUUGCG UA	gma-miR4370	10	17	0	10	chr11	28937222	28937287	+	--	Soy-specific
AAGUGAUGACGUGGUAGACGGA GU	gma-miR4371b	10	16	10	20	chr7	24370816	24370998	-	MIPF0001141	Soy-specific
AAGUGAUGACGUGGUAGACGGA GU	gma-miR4373	10	0	0	0	chr17	6360081	6360184	-	MIPF0001117	Soy-specific

UAUGUUAACUGAUUUCAUGGAU	gma-miR4382	10	0	12	13	chr6	18881198	18881368	+	--	Soy-specific
AAUCAGACACUGCAUUCAAAGA CG	gma-miR4384	14	0	0	0	chr12	9054935	9055000	+	--	Soy-specific
UGGAUAGGAGUAUGGGCUUGAG	gma-miR4395	16	15	0	11	chr2	33485031	33485139	+	--	Soy-specific
CAUCGUUGACGCUGACUGUACG	gma-miR4397-5p	195	152	127	162	chr4	38550859	38551015	-	--	Soy-specific
UGUCAGCGGAGUGAGAAGACGA AA	gma-miR4398	11	0	0	0	chr1	44037488	44037552	+	--	Soy-specific
ACGGACACCGAACACGACACGGA C	gma-miR4403	10	10	0	16	chr4	665909	666012	+	--	Soy-specific
UAACAACAUUGGAUGAGGGUUG GA	gma-miR4408	0	10	0	0	chr8	28086876	28087016	+	--	Soy-specific
UAACAAGUGGGUUUGUUGACUG	gma-miR4409	62	59	27	56	chr16	5771195	5771255	-	--	Soy-specific
UGUUGCGGGUAUCUUUGCCUC	gma-miR4412-5p	13	12	0	19	chr4	37037465	37037552	-	--	Soy-specific
AAGAGAAUUGUAAGUCACUG	gma-miR4413a	79	0	40	0	chr19	1832822	1832908	+	--	Soy-specific
UAAGAGAAUUGUAAGUCACU	gma-miR4413b	0	13	0	15	chr13	16661157	16661224	-	--	Soy-specific
UUGAUUCUCAUCACAACAUGG	gma-miR4415a-3p/b-3p	25	24	42	41	chr18	56193529	56193704	+	MIPF0001314	Soy-specific
ACGGGUCGCUCUCACCUAGG	gma-miR4416a	1487	1419	0	1670	chr19	40891340	40891469	-	MIPF0001389	Soy-specific
UGGGUGAGAGAAACGCGUAUC	gma-miR4416b	0	12	12	16	chr3	36067834	36067977	-	MIPF0001389	Soy-specific
UCUUCCCUACACCUCCCAUACC	gma-miR482b-3p/d-3p	4661	6685	1576	6539	chr20	36454144	36454212	+	MIPF0000403	conserved
UAUGGGGGGAUUGGGAAGGAA	gma-miR482e	3709	5327	2055	4715	--	--	--	--	MIPF0000403	conserved
AGGCAGUGGCUUGGUUAAGGG	gma-miR4995	11	13	0	0	chr19	38252864	38252953	+	--	Soy-specific
UAGAAGCUCCCAUGUUCUC	gma-miR4996	2162	1850	862	1270	chr15	5437428	5437617	+	--	Soy-specific
GAUCGUCAAGCGCGAAGAUGAG G	gma-miR4997	59	51	12	32	--	--	--	--	MIPF0001334	Soy-specific
AGUUUCGUGACUACAACUUCUG	gma-miR4998	191	145	114	221	--	--	--	--	MIPF0001304	Soy-specific

GGUACCCUUUCAGAUAGUCUCA	gma-miR5034	25	33	20	38	chr6	46560092	46560242	+	--	Soy-specific
UGUUUAGAAGCUCAUAGAAUAG AU	gma-miR5035-3p	29	21	10	21	chr7	1959028	1959178	+	--	Soy-specific
AGAGGCCCUUGGGGAGGAGUAA	gma-miR5036	11	13	0	16	chr8	1774168	1774318	+	MIPF0000216	conserved
AACCCUCAAGGCUUCCUAG	gma-miR5037b	0	0	23	0	chr18	57328532	57328634	+	MIPF0001288	conserved
AGUGGAACUUUGAGGCCUGC	gma-miR5037c	313	464	0	492	chr8	47698518	47698613	+	MIPF0001288	conserved
UGAGAAUUUGGCCUCUGUCCA	gma-miR5038a/b	15	0	0	0	chr9	30857860	30858010	+	MIPF0001368	Soy-specific
GUUGAGCAAGUUGAAGAUGAA	gma-miR5041-3p	51	27	17	42	chr16	30479426	30479576	+	--	Soy-specific
UUUCAUCUUAACUUGCUCAA	gma-miR5041-5p	29	35	12	27	chr16	30479426	30479576	-	--	Soy-specific
UGGGGCUUGAUCCAAGAUAGG	gma-miR5042-3p	19	38	17	20	chr18	10449468	10449618	+	--	Soy-specific
UGUCCCUUCUCUGCACCACC	gma-miR5043	14	23	0	0	chr20	46967498	46967648	+	--	Soy-specific
GUAGUGGAUGCCUAGAGGUCCA	gma-miR5044	35	31	18	31	chr18	57357782	57357932	-	MIPF0001288	conserved
CUAAAGAUUGUCCAAAAGGAA	gma-miR5370	23	24	0	14	chr14	6870104	6870256	+	--	Soy-specific
UUGUUCGAUAAAACUGUUGUG	gma-miR5372	234	172	79	177	chr16	5771324	5771388	-	--	Soy-specific
UCUCUUGAUUCUAGAUGAUGU	gma-miR5373	98	60	46	97	chr16	28005409	28005463	+	--	Soy-specific
UUCAAAUGUCAGAUUAUAAAA	gma-miR5374-3p	80	92	44	106	chr5	12748029	12748248	+	--	Soy-specific
UUAUAGUCUGACAUCUGGAAU	gma-miR5374-5p	290	232	126	311	chr5	12748029	12748248	-	--	Soy-specific
ACUAUAGAAGUACUUGUGGAGC	gma-miR5375	61	42	25	49	chr16	2942348	2942538	+	--	Soy-specific
UGAAGAUUGAAGAAUUUGGGA	gma-miR5376	56	43	14	52	--	--	--	--	MIPF0001304	Soy-specific
GAAAUGAAUGAUGAGGAUGGG GA	gma-miR5380a/b	41	36	44	57	chr11	7797520	7797656	+	MIPF0001331	Soy-specific
UACUUGGUGAAUUGUUGGAUC	gma-miR5559	85	330	164	197	chr19	776239	776380	+	--	Soy-specific
CAAUGUAGUGUGGUAAGUGGUC	gma-miR5669	18	18	21	35	chr2	41839111	41839181	+	--	Soy-specific

CAUGGAAGUGAAUCGGGUGAC	gma-miR5671a	92	70	39	81	chr11	27953059	27953177	-	MIPF0002004	Soy-specific
UACCCGAAUUUGCUUCCAUGAU	gma-miR5671b	0	0	37	0	chr18	4359887	4360116	+	MIPF0002004	Soy-specific
UGGAGGACCUUGAAGGUGCA	gma-miR5767	1008	1073	556	921	chr16	30784546	30784656	-	--	Soy-specific
UGAGGGAAAUGAAGACGACGA	gma-miR5769	64	64	40	99	chr18	7386834	7387003	+	--	Soy-specific
UUAGGACUAUGGUUUGGACGA	gma-miR5770a	4355	4107	1290	1601	chr18	46351571	46351817	-	MIPF0001501	Soy-specific
UUAGGACUAUGGUUUGGACAA	gma-miR5770b	0	0	0	44	chr7	16812503	16812763	-	MIPF0001501	Soy-specific
CAAGUCCAAAGUAGGAAUGUUG CA	gma-miR5779	0	14	0	10	chr6	12762118	12762316	-	--	Soy-specific
CUGAAACUGAGACUGCAUCUGG	gma-miR5781	67	81	116	167	chr6	36774683	36774764	-	--	Soy-specific
UGUCGCAGGAUAGAGGGCACU	gma-miR5786	25	28	15	17	chr19	1947621	1947760	+	--	Soy-specific
GUCGUUGUAGUAGUGG	gma-miR6300	2385	2683	2136	2089	chr8	3181460	3181710	-	--	Soy-specific
UGCUGGAUGUCUUUGAAGGAAU	gma-miR862a	321	273	178	235	chr18	57326469	57326558	-	MIPF0001295	conserved
UGAAGUACUCUGAGCACUGAG	gma-miR9727	14	0	0	10	chr14	6410597	6410796	-	--	Soy-specific
UACGGCUAAGUUCAACUUUGG AG	gma-miR9735	43	51	30	56	chr2	8544212	8544403	-	--	Soy-specific
UUAGCUUCUUACCUUUC	gma-miR9749	11	22	17	21	chr17	13919131	13919250	-	--	Soy-specific
UGAUCCAGGAACUUUCAUCU	gma-miR9755	24	17	19	16	chr1	23400197	23400289	-	--	Soy-specific

3.7.2 Table Supplementary – S2

Result of target genes found with psRNATarget tool for the group of miRNAs that presented counts in all 4 libraries and were differentially expressed (group called G1) - 420 unique glymas

miRNA	Target_Acc,	Expect	UPES	Target_start	Target_end	Target_aligned_fragment	Inhibition	
gma-miR1507a	Glyma.06G254300	3	11,6	877	898	UUGGAUGACGUAUGGAAUGAA A	Cleavage	(1 of 38) PTHR23155//PTHR23155:SF414 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED
gma-miR1507a	Glyma.01G035400	3	11,79	1513	1534	UUGGAUGAUGUGUGGGAUGAU A	Cleavage	(1 of 27) PTHR23155//PTHR23155:SF505 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED
gma-miR1507a	Glyma.01G035800	4	11,18	778	799	UUAGAUGAUGUGUGGGAUGAU G	Cleavage	(1 of 27) PTHR23155//PTHR23155:SF505 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED
gma-miR1507a	Glyma.03G136400	4,5	11,78	709	730	UUGGAUGAUUAUGGAAUGAU G	Cleavage	(1 of 34) PTHR23155//PTHR23155:SF563 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED
gma-miR1507a	Glyma.02G030700	3	13,31	1182	1203	UUGGAUGAUGUGUGGGAUGAU A	Cleavage	(1 of 27) PTHR23155//PTHR23155:SF505 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED
gma-miR1507a	Glyma.16G058400	3,5	13,32	1341	1362	AUAGAUGGUGUGUUGAGUGAG A	Cleavage	(1 of 6) PF12854//PF13041//PF13812 - PPR repeat (PPR_1) // PPR repeat family (PPR_2) // Pentatricopeptide repeat domain (PPR_3)
gma-miR1507a	Glyma.01G055100	4	13,03	115	136	UUAGAUGAUGUGUGGGAUGAU G	Cleavage	(1 of 27) PTHR23155//PTHR23155:SF505 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED
gma-miR1507a	Glyma.19G137200	4	13,69	886	907	UUGGAUGACGUAUGGAAUGAU G	Cleavage	(1 of 34) PTHR23155//PTHR23155:SF563 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED
gma-miR1507a	Glyma.01G065800	4	13,77	906	927	UUGGAUGAUGUGUGGGAUGAA G	Cleavage	(1 of 27) PTHR23155//PTHR23155:SF505 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED

gma-miR1507a	Glyma.03G045300	4	14,09	628	649	UUGGAUGAUGUAUGGAUCGAG G	Cleavage	(1 of 31) PTHR23155//PTHR23155:SF562 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR1507a	Glyma.19G042600	3,5	14,67	553	574	UUGGAUGAUGUGUGGAAUGAU G	Cleavage	(1 of 27) PTHR23155//PTHR23155:SF505 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR1507a	Glyma.01G035400	5	13,17	2065	2086	GGUGAGGAUCUAUGGAAUGAA C	Cleavage	(1 of 27) PTHR23155//PTHR23155:SF505 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR1507a	Glyma.02G030700	5	13,34	1740	1761	GGUGAUGGUUAUUGGAAUGAA C	Cleavage	(1 of 27) PTHR23155//PTHR23155:SF505 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR1507a	Glyma.15G186800	4	14,71	826	847	UUAGAUGACGUGUGGGAUGAU A	Cleavage	(1 of 27) PTHR23155//PTHR23155:SF505 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR1507a	Glyma.08G217800	3,5	15,35	587	608	UUGGAUAGUGUAUGGAAUGAA A	Cleavage	(1 of 3) PTHR12663//PTHR12663:SF5 - ANDROGEN INDUCED INHIBITOR OF PROLIFERATION AS3 / PDS5-RELATED // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR1507a	Glyma.11G151900	3,5	15,75	676	697	UUGGAUGAUGUUUGGAAUGAA A	Translation	(1 of 38) PTHR23155//PTHR23155:SF414 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR1507a	Glyma.02G026200	3	16,26	829	850	UUGGAUGAUGUGUGGGAUGAU A	Cleavage	(1 of 27) PTHR23155//PTHR23155:SF505 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR1507a	Glyma.19G139700	4,5	15,01	988	1009	UUGGAUGAUUAUGGAAUGAU G	Cleavage	(1 of 34) PTHR23155//PTHR23155:SF563 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR1507a	Glyma.19G009600	3,5	16,27	647	668	UUAGAUGAUGUUUGGAAUGAA A	Translation		0
gma-miR1507a	Glyma.15G186800	3	17,5	1381	1402	GGUGAUGAUGUAUGGAAUGAA U	Cleavage	(1 of 27) PTHR23155//PTHR23155:SF505 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	

gma-miR1507a	Glyma.08G305400	4	16,73	1104	1126	UUAGAUGAUGUAUGGAGUGUA GA	Cleavage	(1 of 32) K13457 - disease resistance protein RPM1 (RPM1, RPS3)	
gma-miR1507a	Glyma.03G137200	3,5	17,52	970	991	UUGGACGACGUAUGGAAUGAA G	Cleavage	(1 of 34) PTHR23155//PTHR23155:SF563 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR1507a	Glyma.13G169400	4,5	17,53	527	548	UUGGAUGAUGUUUGGAAUGAA C	Translation		0
gma-miR1507a	Glyma.06G254300	4,5	17,59	244	265	GCCGAGGAUGUCUUGGAUGAG A	Translation	(1 of 38) PTHR23155//PTHR23155:SF414 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR1507a	Glyma.19G134200	4	18,61	959	980	UUGGAUGACGUAUGGAAUGAU G	Cleavage	(1 of 34) PTHR23155//PTHR23155:SF563 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR1507a	Glyma.02G026200	5	17,61	1384	1405	GGUGAUGGAGUGUGGAAUGAA U	Cleavage	(1 of 27) PTHR23155//PTHR23155:SF505 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR1507a	Glyma.01G065800	4	18,81	1461	1482	GGUGAUGGUGUGUGGAAUGAA U	Cleavage	(1 of 27) PTHR23155//PTHR23155:SF505 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR1507a	Glyma.05G006900	3,5	20,23	1056	1077	UUGGAUGAUGUUUGGAAUGAA A	Translation	(1 of 38) PTHR23155//PTHR23155:SF414 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR1507a	Glyma.19G135600	4	19,86	1050	1071	UUGGAUGACGUAUGGAAUGAU G	Cleavage	(1 of 34) PTHR23155//PTHR23155:SF563 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR1507a	Glyma.19G135700	4	20,14	889	910	UUGGAUGACGUAUGGAAUGAU G	Cleavage	(1 of 34) PTHR23155//PTHR23155:SF563 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR1507a	Glyma.19G135400	4	20,53	862	883	UUGGAUGACGUAUGGAAUGAU G	Cleavage	(1 of 34) PTHR23155//PTHR23155:SF563 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	

gma-miR1507a	Glyma.19G137000	4	20,58	508	529	UUGGAUGACGUAUGGAAUGAU G	Cleavage	(1 of 34) PTHR23155//PTHR23155:SF563 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR1507a	Glyma.03G048200	4	20,7	909	930	UUGGAUGACGUAUGGAAUGAU G	Cleavage	(1 of 34) PTHR23155//PTHR23155:SF563 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR1507a	Glyma.19G135500	4	21,27	532	553	UUGGAUGACGUAUGGAAUGAU G	Cleavage	(1 of 34) PTHR23155//PTHR23155:SF563 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR1507a	Glyma.19G085600	4	22,09	814	835	UUGGAUGACGUAUGGAAUGAU G	Cleavage	(1 of 34) PTHR23155//PTHR23155:SF563 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR1507a	Glyma.19G136900	4	22,25	862	883	UUGGAUGACGUAUGGAAUGAU G	Cleavage	(1 of 34) PTHR23155//PTHR23155:SF563 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR1507a	Glyma.11G214800	5	22,03	1494	1515	UCAAUAUGUAUGGGGUGAA G	Cleavage	(1 of 2) K03934 - NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1 (NDUFS1)	
gma-miR1507a	Glyma.18G041700	5	23,2	1309	1330	UCAAUAUGUAUGGGGUGAA G	Cleavage	(1 of 2) K03934 - NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1 (NDUFS1)	
gma-miR1507c- 5p	Glyma.02G280900	3,5	5,805	28	48	UUCUUUCAUUUUAACAUCUA	Cleavage		0
gma-miR1507c- 5p	Glyma.11G005100	4	5,996	2084	2104	CCUUUAUAUUUUAACACCUC	Cleavage	(1 of 2) PTHR30457:SF0 - 5'/3'- NUCLEOTIDASE SURE	
gma-miR1507c- 5p	Glyma.10G244000	3	7,318	284	304	AUUUUUAUCUCAACACCUA	Cleavage	(1 of 3) PTHR10015:SF139 - HEAT STRESS TRANSCRIPTION FACTOR A-6A-RELATED	
gma-miR1507c- 5p	Glyma.08G111400	3,5	6,891	249	270	CUUUCUCAUCCCAAACACCU C	Cleavage	(1 of 1) PTHR32387:SF0 - NO VEIN-LIKE PROTEIN-RELATED	

gma-miR1507c-5p	Glyma.01G121700	3	7,557	79	99	UUUUAUCAUCCCAAACAACUC	Cleavage	(1 of 4) PTHR12231:SF111 - MATRIX-REMODELING-ASSOCIATED PROTEIN 8	
gma-miR1507c-5p	Glyma.07G191500	4,5	6,239	19	39	UUCUCUCAUUUCAACGUCAA	Cleavage	(1 of 4) PTHR20854//PTHR20854:SF33 - INOSITOL MONOPHOSPHATASE // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR1507c-5p	Glyma.17G237400	4,5	6,337	32	52	UUCUCUCAUCUCAGAUUCAU	Cleavage		0
gma-miR1507c-5p	Glyma.19G008000	3	11,32	245	265	GUUUCUCAUCUCAAGAUCUC	Cleavage		0
gma-miR1507c-5p	Glyma.08G178400	3	11,5	207	227	CUCUCUCAUCCGAGCUCCUC	Cleavage		0
gma-miR1507c-5p	Glyma.19G073600	4	10,64	456	476	UUCUUUAUCCCAUACACUUG	Cleavage	(1 of 2) PTHR24089:SF398 - NICOTINAMIDE ADENINE DINUCLEOTIDE TRANSPORTER 2, MITOCHONDRIAL	
gma-miR1507c-5p	Glyma.03G137400	3,5	11,28	84	104	UUCUUUCAUUACAAACAUUUC	Translation	(1 of 4) PTHR12444:SF0 - PROTEIN EFR3 HOMOLOG CMP44E	
gma-miR1507c-5p	Glyma.05G242800	3,5	11,65	2748	2768	UUCUUUCUUCUCAACACUUA	Cleavage	(1 of 2) PTHR18934:SF112 - DEA(D/H)-BOX RNA HELICASE FAMILY PROTEIN	
gma-miR1507c-5p	Glyma.09G145600	3	12,37	331	351	CUCUUUCACCUCAAACACCUU	Cleavage	(1 of 2) PTHR27004:SF3 - RECEPTOR LIKE PROTEIN 54	
gma-miR1507c-5p	Glyma.14G024000	3,5	12,76	2571	2591	UUCUCUUGUGCUAAAUACCUC	Cleavage	(1 of 4) PTHR31071:SF2 - F11F12.2 PROTEIN	
gma-miR1507c-5p	Glyma.08G050200	3,5	13,72	2616	2636	UUCUUUCUUCUCAACACUUA	Cleavage	(1 of 2) PTHR18934:SF112 - DEA(D/H)-BOX RNA HELICASE FAMILY PROTEIN	

gma-miR1507c-5p	Glyma.08G229100	4,5	13,12	406	427	UUUUCUCAGUCUCAAAACACUUC	Cleavage	(1 of 2306) 2.7.11.1 - Non-specific serine/threonine protein kinase / Threonine-specific protein kinase
gma-miR1507c-5p	Glyma.15G070700	3	16,3	325	345	GUUUCUCAUCUCAAAAUCCUC	Cleavage	(1 of 2) PTHR31008:SF6 - CSL1
gma-miR1507c-5p	Glyma.13G242800	3	18,01	474	494	GUUUCUCAUCUCAAAAUCCUC	Cleavage	(1 of 2) PTHR31008:SF6 - CSL1
gma-miR1507c-5p	Glyma.06G002600	3,5	17,84	1761	1782	UUCUCUCAUCCCAAACCACCUU	Cleavage	(1 of 2) PTHR24031:SF181 - DEAD-BOX ATP-DEPENDENT RNA HELICASE 50
gma-miR1507c-5p	Glyma.16G150000	3,5	18,12	170	190	UUUUCUCAUCUCCAACAUCUU	Cleavage	(1 of 5) K03265 - peptide chain release factor subunit 1 (ETF1, ERF1)
gma-miR1507c-5p	Glyma.17G204600	3	20,1	70	90	CUCUUUCACCUCAAACACCUU	Cleavage	(1 of 2) PTHR27004:SF3 - RECEPTOR LIKE PROTEIN 54
gma-miR1507c-5p	Glyma.08G264100	3,5	22,54	137	157	UUCUCUCAUCUCAGCCAUUUC	Cleavage	(1 of 4) PTHR22880:SF163 - TRANSCRIPTION FACTOR GTE1
gma-miR1508c	Glyma.02G019100	3	9,168	506	526	UAAUUGCUIUUUCCUUUUUUA	Cleavage	(1 of 5) PTHR24326:SF176 - HOMEBOX-LEUCINE ZIPPER PROTEIN ATHB-13-RELATED
gma-miR1508c	Glyma.19G214000	3	9,738	1568	1588	AAACUGUUUUUUCUUUUUCUA	Cleavage	(1 of 4) K08489 - syntaxin 16 (STX16)
gma-miR1508c	Glyma.14G023500	3	10,11	2116	2136	CAACUCUUAUUUCUCUUUUUG	Cleavage	(1 of 7) PTHR24349:SF89 - CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE 29
gma-miR1508c	Glyma.01G238800	3,5	10,16	1990	2010	CAAUUGUUAUUUCAUUUCUG	Cleavage	(1 of 6) PTHR23500:SF70 - SUGAR TRANSPORT PROTEIN 13

gma-miR1508c	Glyma.06G217900	4	9,839	365	385	CAAUUGCUGUUUUUGUUUCUG	Cleavage	(1 of 2) PTHR33149:SF1 - PHOTOSYSTEM II D2 PROTEIN	
gma-miR1508c	Glyma.11G227600	4	12,91	1	21	UAACUGUUUUUUUCUUUCAU	Cleavage	(1 of 152) PF02458 - Transferase family (Transferase)	
gma-miR1508c	Glyma.11G105700	3	14,13	1301	1321	UAAUUGCUGUUUCUUUUUCUU	Cleavage	(1 of 3) KOG4306 - Glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase C	
gma-miR1508c	Glyma.09G174500	3	14,16	233	253	CAACUGCUAUAUCACUUUCUA	Translation	(1 of 4) 3.2.1.45 - Glucosylceramidase / D-glucosyl-N-acylsphingosine glucohydrolase	
gma-miR1508c	Glyma.01G193900	4	13,48	1705	1725	CAGUUGCUAUUUUUUUUUUUUU	Cleavage	(1 of 40) PF00651//PF03000 - BTB/POZ domain (BTB) // NPH3 family (NPH3)	
gma-miR1508c	Glyma.10G276600	3,5	14,58	734	754	CAGCUGCUAUUUCCUUUGCUU	Cleavage	(1 of 5) KOG2504 - Monocarboxylate transporter	
gma-miR1508c	Glyma.09G174600	3	15,44	230	250	CAACUGCUAUAUCACUUUCUA	Translation	(1 of 24) PF12854//PF13041 - PPR repeat (PPR_1) // PPR repeat family (PPR_2)	
gma-miR1508c	Glyma.18G066500	5	14,47	211	231	CAACUGUUUUUCCUUUUACG	Cleavage	(1 of 7) PF13432 - Tetratricopeptide repeat (TPR_16)	
gma-miR1508c	Glyma.16G004600	3	21,5	1252	1272	CAAUCCUAUUUCCUUUUUCUU	Cleavage		0
gma-miR1509a	Glyma.12G028600	4,5	9,365	488	510	UGAUUGUGAUUUUCUUGGAUU AA	Cleavage		0
gma-miR1509a	Glyma.09G266800	3,5	11,99	100	122	CAACUGUGAUUUCCUUUGAUU AA	Cleavage		0

gma-miR1509a	Glyma.18G097600	4	12,48	2	23	UGAUUGUCAUUUUCUUGAGUA A	Cleavage	(1 of 10) PTHR11206:SF109 - MATE EFFLUX FAMILY PROTEIN
gma-miR1509a	Glyma.08G079600	4	12,75	285	306	CGACCCUGAUGUCCUUGAUUG C	Cleavage	(1 of 4) PTHR10315:SF43 - E3 UBIQUITIN-PROTEIN LIGASE
gma-miR1509a	Glyma.16G139400	4,5	12,59	1099	1120	CGAUGGUGAUUCCUAAUUA A	Cleavage	(1 of 5) PTHR10071:SF156 - GATA TRANSCRIPTION FACTOR 18-RELATED
gma-miR1509a	Glyma.14G078200	3	15,55	1805	1826	UUACUGUGAGUUCUUGAUUA G	Cleavage	(1 of 2) PTHR12956//PTHR12956:SF17 - ALKALINE CERAMIDASE-RELATED // SUBFAMILY NOT NAMED
gma-miR1509a	Glyma.20G177100	4,5	14,78	988	1009	UGACUGUGGUUCCUAGUGA A	Cleavage	(1 of 4) K12831 - splicing factor 3B subunit 4 (SF3B4, SAP49)
gma-miR1509a	Glyma.06G227700	4	16,53	1562	1583	AAACUGUGGUUCCUUGGUUU G	Cleavage	(1 of 11) PTHR24015:SF884 - PENTATRICOPEPTIDE (PPR) REPEAT-CONTAINING PROTEIN
gma-miR1509a	Glyma.13G174600	3	18,02	6374	6395	AUAUUGGGAUUUCUUGAUUG A	Cleavage	(1 of 1) PTHR16166//PTHR16166:SF87 - VACUOLAR PROTEIN SORTING-ASSOCIATED PROTEIN VPS13 // SUBFAMILY NOT NAMED
gma-miR1509a	Glyma.15G178000	4,5	17,02	1050	1071	AGAUCGUGAUUCCUUGCCUA C	Cleavage	(1 of 4) PTHR10795:SF434 - SUBTILISIN SERINE PROTEASE-RELATED
gma-miR1509a	Glyma.17G247200	3	18,61	1794	1815	UUACUGUGAGUUCUUGAUUA G	Cleavage	(1 of 2) PTHR12956//PTHR12956:SF17 - ALKALINE CERAMIDASE-RELATED // SUBFAMILY NOT NAMED
gma-miR1509a	Glyma.16G001100	3,5	18,36	278	299	UCCUCGUGGUUCCUUGAUUU C	Cleavage	(1 of 24) PF05212 - Protein of unknown function (DUF707) (DUF707)
gma-miR1509a	Glyma.15G268800	3,5	18,71	3228	3249	CAAUUGUGAUUUCUUGCUUG A	Cleavage	(1 of 2) PTHR12741:SF9 - CALLOSE SYNTHASE 1-RELATED

gma-miR1509a	Glyma.20G084500	3,5	18,84	1810	1831	AGGUAGUGGUUUUCUUUGAUUA U	Cleavage	(1 of 2) K10599 - pre-mRNA-processing factor 19 (PRPF19, PRP19)	
gma-miR1509a	Glyma.06G183600	3,5	19,4	225	246	AAAUUGUGAUUUCCUUGAUCA U	Cleavage	(1 of 5) PTHR14155//PTHR14155:SF103 - RING FINGER DOMAIN-CONTAINING // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR1509a	Glyma.12G087000	5	17,95	3154	3175	AGACAGUGAGUUGCUUGAUUA U	Translation	(1 of 1) K02324 - DNA polymerase epsilon subunit 1 (POLE1)	
gma-miR1509a	Glyma.04G181300	3,5	20,06	112	133	AAAUUGUGAUUUCCUUGAUCA U	Cleavage	(1 of 5) PTHR14155//PTHR14155:SF103 - RING FINGER DOMAIN-CONTAINING // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR1509a	Glyma.09G134200	3,5	20,73	1174	1195	UGACUGUCAUUUUCUUGAGUA A	Cleavage	(1 of 10) PTHR11206:SF109 - MATE EFFLUX FAMILY PROTEIN	
gma-miR1509a	Glyma.01G176700	4,5	20,57	786	807	GGACCGUGAUUUUCUUGGAAUA C	Cleavage	(1 of 330) PF01535//PF13041 - PPR repeat (PPR) // PPR repeat family (PPR_2)	
gma-miR1509a	Glyma.08G253000	3	23	672	693	GAACAGUGAUUUUCUUGGUUG G	Cleavage	(1 of 4) PTHR15245:SF11 - PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE-RELATED PROTEIN KINASE	
gma-miR1510b-3p	Glyma.12G132200	3	16	824	844	GGUGGAAUAGGAAAGACAACU	Translation	(1 of 25) PF00931//PF07725//PF13676 - NB-ARC domain (NB-ARC) // Leucine Rich Repeat (LRR_3) // TIR domain (TIR_2)	
gma-miR1510b-3p	Glyma.13G076200	3	24,02	978	998	GGUGGAAUAGGUAAGACCACC	Cleavage	(1 of 37) PTHR11017//PTHR11017:SF162 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR1523a	Glyma.10G259500	3,5	6,044	87	106	UGAUCUCACAUUCAUUCUAU	Cleavage	(1 of 19) PF04788 - Protein of unknown function (DUF620) (DUF620)	
gma-miR1523a	Glyma.04G096000	3,5	6,44	38	57	AUAGCUCACAUUUGUCUCUU	Cleavage	(1 of 5) PTHR23257:SF349 - PROTEIN KINASE FAMILY PROTEIN	
gma-miR1523a	Glyma.01G153800	4	7,941	518	537	AAUGCUCAU AUGUAUCCCAU	Cleavage		0
gma-miR1523a	Glyma.01G103700	4	8,146	122	141	AAUGCUCAU AUGUAUCCCAU	Cleavage		0

gma-miR1523a	Glyma.19G124400	3,5	8,787	142	161	GGAGCUCACAUUUACUUCAC	Cleavage		0
gma-miR1523a	Glyma.12G209000	3,5	9,226	193	212	AGAGUUUACAUAUAUUUCAU	Cleavage		0
gma-miR1523a	Glyma.13G051500	3,5	9,916	1445	1464	AGAGCUUGUAUUUUUCUCAU	Cleavage	(1 of 25) KOG1552 - Predicted alpha/beta hydrolase	
gma-miR1523a	Glyma.18G109600	3,5	10,6	361	380	UGACCUCAUAUUGAUCUCAU	Cleavage	(1 of 12) KOG1619 - Cytochrome b	
gma-miR1523a	Glyma.20G101100	4	11,46	908	927	UGAACUCAAAUUUAUUUUUAU	Cleavage	(1 of 1) PTHR11260//PTHR11260:SF327 - GLUTATHIONE S-TRANSFERASE, GST, SUPERFAMILY, GST DOMAIN CONTAINING // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR1523a	Glyma.16G171200	3,5	11,97	1623	1642	AGAGCUUGGAUUUAUCUUAU	Cleavage	(1 of 7) 2.7.11.1//3.2.1.15 - Non-specific serine/threonine protein kinase / Threonine-specific protein kinase // Polygalacturonase / Pectinase	
gma-miR1523a	Glyma.20G046800	3,5	12,28	67	86	UGAGUUGACAUUUUUCCAU	Cleavage	(1 of 1) 2.7.1.148//2.7.4.26 - 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase / CMK // Isopentenyl phosphate kinase	
gma-miR1523a	Glyma.13G099200	4	11,88	1373	1392	UGUGUUCACAUUUAUCACAC	Cleavage	(1 of 2) K19306 - 18S rRNA (guanine1575-N7)-methyltransferase [EC:2.1.1.309] (BUD23)	
gma-miR1523a	Glyma.13G335800	4	12,77	170	189	UGAGCAUACCUUUGUCCAU	Translation	(1 of 6) PTHR12276:SF10 - ENTH/VHS FAMILY PROTEIN	
gma-miR1523a	Glyma.05G176400	4,5	12,62	875	894	UGAGCUUACAUUUUUCUUGC	Cleavage	(1 of 6) K14396 - polyadenylate-binding protein 2 (PABPN1, PABP2)	
gma-miR1523a	Glyma.16G126000	3,5	13,68	1574	1593	AGAGCUUGGAUUUAUCUUAU	Cleavage	(1 of 117) PF00560//PF08263//PF13855 - Leucine Rich Repeat (LRR_1) // Leucine rich repeat N-terminal domain (LRRNT_2) // Leucine rich repeat (LRR_8)	
gma-miR1523a	Glyma.09G186500	4,5	13,07	1903	1923	UGAGCUCACAUGAUAUCCCAU	Cleavage	(1 of 442) PF00067 - Cytochrome P450 (p450)	
gma-miR1523a	Glyma.15G038500	4	14,05	190	209	UGGGCACACCUUUGUCCAU	Translation	(1 of 6) PTHR12276:SF10 - ENTH/VHS FAMILY PROTEIN	
gma-miR1523a	Glyma.05G060600	3,5	14,77	460	479	UAAGCUCACCUUUUUUCAU	Translation	(1 of 16) PF05703 - Auxin canalisation (Auxin_canalis)	

gma-miR1523a	Glyma.20G178400	3	15,41	1379	1398	CUAGCUCACGUUUUAUCCAA	Cleavage	(1 of 1) PTHR11079:SF98 - PROTEIN ZK287.7
gma-miR1523a	Glyma.16G125300	3,5	15,87	1319	1338	AGAGCUUGGAUUUAUCUUAU	Cleavage	(1 of 117) PF00560//PF08263//PF13855 - Leucine Rich Repeat (LRR_1) // Leucine rich repeat N-terminal domain (LRRNT_2) // Leucine rich repeat (LRR_8)
gma-miR1523a	Glyma.09G009700	3,5	16,04	1076	1095	UGAAGUCAUAUUUAUUCUAU	Cleavage	(1 of 4) PTHR31579:SF15 - F2401.16
gma-miR1523a	Glyma.16G171200	5	14,67	2000	2019	AUGUCUCACAAUUAUCUCAU	Translation	(1 of 7) 2.7.11.1//3.2.1.15 - Non-specific serine/threonine protein kinase / Threonine-specific protein kinase // Polygalacturonase / Pectinase
gma-miR1523a	Glyma.02G049800	3,5	17,05	2684	2703	GAGGUUCAUAUUUAUCUUAU	Cleavage	(1 of 2) PTHR24012:SF362 - RNA RECOGNITION MOTIF-CONTAINING PROTEIN
gma-miR1523a	Glyma.07G039800	4,5	16,08	1658	1677	UGAGCUUAUGUUUGUCACAC	Cleavage	(1 of 19) 1.14.13.21 - Flavonoid 3'-monooxygenase / Flavonoid 3'-hydroxylase
gma-miR1523a	Glyma.04G142200	4,5	17,07	459	478	UGAGCUCACCUUUUAUCUCUC	Translation	(1 of 35) 2.7.7.49 - RNA-directed DNA polymerase / Revertase
gma-miR1523a	Glyma.13G121700	4	18,29	974	993	UGGGUUCACAUUAAGCCCAU	Cleavage	(1 of 1) PTHR10209//PTHR10209:SF175 - OXIDOREDUCTASE, 2OG-FE II OXYGENASE FAMILY PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED
gma-miR1523a	Glyma.16G008600	4,5	18,46	1670	1689	UGAGCUUAUGUUUGUCACAC	Cleavage	(1 of 19) 1.14.13.21 - Flavonoid 3'-monooxygenase / Flavonoid 3'-hydroxylase
gma-miR1523a	Glyma.13G182000	3	19,98	1005	1024	GGAGGUUACAUUUAUCCCGG	Cleavage	(1 of 13) PTHR10992//PTHR10992:SF869 - ALPHA/BETA HYDROLASE FOLD-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED
gma-miR1523a	Glyma.04G137500	4,5	18,85	645	664	UGAGUUCGCUUUAUCUCAU	Translation	(1 of 87) PF14223 - gag-polypeptide of LTR copia-type (UBN2)
gma-miR1523a	Glyma.07G071800	4	19,41	1520	1539	UGGGCUCACAUUUUUCUUAG	Cleavage	(1 of 3) 3.5.4.26 - Diaminohydroxyphosphoribosylaminopyrimidine deaminase
gma-miR1523a	Glyma.18G146000	5	18,79	393	412	UGAGCUCACCUUUUAUUUCUC	Translation	(1 of 16) PTHR11439//PTHR11439:SF192 - GAG-POL-RELATED RETROTRANSPOSON // SUBFAMILY NOT NAMED

gma-miR1523a	Glyma.15G099800	4	19,82	61	80	UGAAUUCACAUUGAUUCUAU	Cleavage	(1 of 3) PTHR28242:SF5 - HISTIDINE-CONTAINING PHOSPHOTRANSFER PROTEIN 1	
gma-miR1523a	Glyma.10G284400	3,5	20,97	498	517	UUAGUUCAGGUUUUAUCCCAU	Cleavage	(1 of 2) PTHR23257:SF347 - SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE KINX-RELATED	
gma-miR1523a	Glyma.08G022800	4,5	20,53	412	431	UGAGCUUGUGUUGAUCCAG	Cleavage		0
gma-miR1523a	Glyma.02G063900	3,5	22,22	1282	1301	UUGGCUUCCAUUUUAUCCCAU	Cleavage	(1 of 7) PTHR31942:SF29 - MLO-LIKE PROTEIN 12-RELATED	
gma-miR1523a	Glyma.05G060600	5	20,9	877	896	UGAACUCAAAUUGGUUCCAU	Cleavage	(1 of 16) PF05703 - Auxin canalisation (Auxin_canalis)	
gma-miR1523a	Glyma.12G040200	4,5	24,36	526	545	UGAGCUUGGGUUUAUCUCAC	Cleavage	(1 of 2) K14565 - nucleolar protein 58 (NOP58)	
gma-miR160a-3p	Glyma.03G016500	4,5	8,314	191	211	UGUGUUUGGUUCUUUAUUUGU	Cleavage	(1 of 5) PTHR24057:SF19 - SHAGGY-RELATED PROTEIN KINASE BETA-RELATED	
gma-miR160a-3p	Glyma.U042000	4,5	10,69	3032	3052	GAUGCUUGGCCUCCACAGAUGA	Cleavage	(1 of 12) K17943 - pumilio RNA-binding family (PUM)	
gma-miR160a-3p	Glyma.08G155900	4	11,49	1229	1249	UAUUUUUGGCUUCUAAAUGC	Cleavage	(1 of 2) K11126 - telomerase reverse transcriptase (TERT, EST2)	
gma-miR160a-3p	Glyma.U012600	5	10,59	3242	3262	CUUGCUUGGCUUUUCAUAACA	Cleavage	(1 of 13) PTHR23155//PTHR23155:SF554 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR160a-3p	Glyma.14G127500	4	14,13	874	894	CAUGCUUUGCUUUUAUAUGG	Cleavage	(1 of 5) 2.7.11.2 - [Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase / Pyruvate dehydrogenase kinase (phosphorylating)	
gma-miR160a-3p	Glyma.15G274000	4	14,5	1289	1309	UAUUUUUGGCUUCUAAAUGC	Cleavage	(1 of 2) K11126 - telomerase reverse transcriptase (TERT, EST2)	
gma-miR160a-3p	Glyma.09G246500	4,5	15,22	306	326	UGUGCUUGGCUUUUCCUCUGC	Cleavage	(1 of 2) PTHR12709:SF5 - DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE I SUBUNIT RPA43	

gma-miR160a-3p	Glyma.13G364700	3,5	16,24	382	402	AUGGCUUGGCUUCUCAUUCGU	Cleavage	(1 of 104) 3.2.1.15 - Polygalacturonase / Pectinase	
gma-miR160a-3p	Glyma.04G176100	5	14,81	185	204	UAUGUUUGGCUUCUC-UAUGU	Cleavage		0
gma-miR160a-3p	Glyma.12G157600	4,5	15,54	1233	1253	UGUGUUUGGCUAUUCAUGCAC	Translation	(1 of 2) PTHR12472 - RAB3-GAP REGULATORY DOMAIN	
gma-miR160a-3p	Glyma.06G154600	4	16,65	2397	2417	UAUGUUUGAUUCCUCAGACGC	Cleavage	(1 of 330) PF01535//PF13041 - PPR repeat (PPR) // PPR repeat family (PPR_2)	
gma-miR160a-3p	Glyma.19G080400	3,5	17,36	1385	1405	CUUGUUUGGCCUUUCAUACGU	Translation		0
gma-miR160a-3p	Glyma.06G229100	5	16,25	493	513	AAUGCUUGGUCCCUC AUGCAU	Translation	(1 of 2) K08073 - bifunctional polynucleotide phosphatase/kinase [EC:3.1.3.32 2.7.1.78] (PNKP)	
gma-miR160a-3p	Glyma.02G142900	3	18,57	127	147	AAUGCUGGGCUUCUCAUAUGG	Cleavage		0
gma-miR160a-3p	Glyma.06G228900	4,5	17,6	1390	1410	UGUGUUUGGCUAUUCAUGCAC	Translation	(1 of 2) PTHR12472 - RAB3-GAP REGULATORY DOMAIN	
gma-miR160a-3p	Glyma.18G246500	4,5	18,08	332	352	UGUGCUUGGCUUUUCCUCUGC	Cleavage	(1 of 2) PTHR12709:SF5 - DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE I SUBUNIT RPA43	
gma-miR160a-3p	Glyma.10G031500	3,5	19,84	221	241	AAUGCUGGGCUUUUCAUAUGG	Cleavage		0
gma-miR160a-3p	Glyma.18G268100	3	20,76	1043	1063	AUUGCGUGGCUUCUCAUAUGG	Cleavage	(1 of 14) 2.3.1.115 - Isoflavone-7-O-beta-glucoside 6"-O-malonyltransferase / Flavone/flavonol 7-O-beta-D-glucoside malonyltransferase	

gma-miR160a-3p	Glyma.10G164400	5	19,19	363	383	GAUGCUUGGCUUUUCAUCCCU	Cleavage		0
gma-miR160a-3p	Glyma.20G107200	3,5	24,3	282	302	CAUCCUUGGCUCUUCAUAGGU	Cleavage	(1 of 6) PTHR13789:SF185 - FAD/NAD(P)- BINDING OXIDOREDUCTASE FAMILY PROTEIN	
gma-miR162b/c	Glyma.08G093400	3,5	9,241	1457	1477	AGUUAUGCAGAGGUUUAUGGA	Cleavage	(1 of 1) PTHR12001:SF41 - HETERODIMERIC GERANYLGERANYL PYROPHOSPHATE SYNTHASE SMALL SUBUNIT, CHLOROPLASTIC	
gma-miR162b/c	Glyma.19G261200	3	13,54	3484	3505	CUGGAUGCAGAGGUGUUAUCG A	Cleavage	(1 of 4) PTHR14950:SF3 - ENDORIBONUCLEASE DICER HOMOLOG 1	
gma-miR162b/c	Glyma.07G253000	4,5	13,54	2494	2514	GUGGAUGCAAAGGUUUAUUAU	Cleavage	(1 of 4) PTHR12304:SF6 - INOSINE-URIDINE PREFERRING NUCLEOSIDE HYDROLASE FAMILY PROTEIN	
gma-miR162b/c	Glyma.10G043900	3	15,81	702	722	GCUGAUGCAGGGGUUUAUAGA	Cleavage	(1 of 6) PF12854//PF13041//PF13812 - PPR repeat (PPR_1) // PPR repeat family (PPR_2) // Pentatricopeptide repeat domain (PPR_3)	
gma-miR162b/c	Glyma.03G262100	3	16,02	3530	3551	CUGGAUGCAGAGGUGUUAUCG A	Cleavage	(1 of 4) PTHR14950:SF3 - ENDORIBONUCLEASE DICER HOMOLOG 1	
gma-miR162b/c	Glyma.10G075900	3,5	16,65	1747	1767	UUGGAUGCAGAGCUUUAUUA	Cleavage	(1 of 2) PTHR14009:SF9 - LETM1-LIKE PROTEIN	
gma-miR162b/c	Glyma.03G103300	5	15,54	172	192	CUUGAUGCAGAGGUUCAUCUC	Cleavage	(1 of 6) PTHR23410 - RIBOSOMAL PROTEIN L5-RELATED	
gma-miR162b/c	Glyma.15G017400	4	16,81	2146	2166	UUGGGUGUGGAGGUUUAUGGU	Cleavage	(1 of 330) PF01535//PF13041 - PPR repeat (PPR) // PPR repeat family (PPR_2)	
gma-miR162b/c	Glyma.07G060000	3	18,1	716	736	CUUGAUGCAGAGGUUCAUCGG	Cleavage	(1 of 5) K02932 - large subunit ribosomal protein L5e (RP-L5e, RPL5)	

gma-miR162b/c	Glyma.13G148300	3	18,17	1645	1665	CUAGAUUCAGAGGUUUAUUGG	Cleavage	(1 of 3) PTHR21737:SF4 - CACTIN	
gma-miR162b/c	Glyma.13G071900	4,5	18,1	361	382	UUGGAUGCAGAGGAUUUGUUG G	Cleavage	(1 of 10) PTHR23155//PTHR23155:SF560 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR162b/c	Glyma.02G200700	3,5	19,34	1782	1802	UUGGAUGCAGAGCUUUAUUA	Cleavage	(1 of 2) PTHR14009:SF9 - LETM1-LIKE PROTEIN	
gma-miR162b/c	Glyma.17G201600	5	19,46	596	616	CUGGAUGUGGAGGUUCUCUG	Cleavage	(1 of 23) PF04755 - PAP_fibrillin (PAP_fibrillin)	
gma-miR166a-5p/c-5p/l	Glyma.19G251400	4,5	10,87	324	344	CUUAGAGUCAGAUACAUAUGA	Cleavage	(1 of 7) PF03108//PF04434//PF10551 - MuDR family transposase (DBD_Tnp_Mut) // SWIM zinc finger (SWIM) // MULE transposase domain (MULE)	
gma-miR166a-5p/c-5p/l	Glyma.01G117800	3,5	13,69	589	609	GCUUUAGCCGGAUAACAUAUUU	Cleavage	(1 of 1) K10863 - aprataxin [EC:3.-.-.] (APTX)	
gma-miR166a-5p/c-5p/l	Glyma.11G044000	3,5	13,8	364	384	ACUCAAGCUAGCUACAUAUCC	Translation		0
gma-miR166a-5p/c-5p/l	Glyma.14G018600	3,5	14,52	1063	1083	UUUUAAGCCAGAUACAUAUCC	Cleavage	(1 of 3) K00981 - phosphatidate cytidyltransferase (E2.7.7.41, CDS1, CDS2, cdsA)	
gma-miR166a-5p/c-5p/l	Glyma.08G104700	3,5	14,6	12	32	CCUCAACCCAGACAGCGUUUC	Cleavage	(1 of 2) K14848 - ribosome assembly protein RRB1 (RRB1, GRWD1)	
gma-miR166a-5p/c-5p/l	Glyma.04G184200	3,5	14,74	905	925	CUUUGCCCCAGACAGCAUUUC	Cleavage	(1 of 5) PTHR10641:SF570 - TRANSCRIPTION FACTOR MYB98	
gma-miR166a-5p/c-5p/l	Glyma.15G063400	3	15,64	960	980	CUUCGAAGCAGACAAUAUUUC	Cleavage	(1 of 2) K02553 - regulator of ribonuclease activity A (rraA, menG)	

gma-miR166a-5p/c-5p/1	Glyma.10G155100	3	16,1	2558	2578	UUUUGAGCUAGAUGGCAUUUC	Cleavage		0
gma-miR166a-5p/c-5p/1	Glyma.02G057500	4,5	14,84	1202	1222	CCUCGAGCCAUACAACAAUUA	Translation	(1 of 3) K09587 - steroid 22-alpha-hydroxylase (CYP90B1, DWF4)	
gma-miR166a-5p/c-5p/1	Glyma.04G150300	4	15,51	453	473	CCUGAAGCCAGAGAACAUUCU	Cleavage	(1 of 1) KOG0662//KOG1164 - Cyclin-dependent kinase CDK5 // Casein kinase (serine/threonine/tyrosine protein kinase)	
gma-miR166a-5p/c-5p/1	Glyma.15G019400	4	16,4	1178	1198	CCUCAAGGCAGUCAGCAUUC	Translation	(1 of 2) PTHR24078:SF169 - DNAJ HOMOLOG SUBFAMILY C MEMBER 17	
gma-miR166a-5p/c-5p/1	Glyma.06G181800	3,5	16,91	1043	1063	CUUUGCCCCAGACAGCAUUUC	Cleavage	(1 of 5) PTHR10641:SF570 - TRANSCRIPTION FACTOR MYB98	
gma-miR166a-5p/c-5p/1	Glyma.08G308600	4	16,67	3061	3081	CCUCAAAUCAGGCAACAUUCA	Cleavage	(1 of 2) PTHR12526:SF360 - SUCROSE-PHOSPHATE SYNTHASE 3-RELATED	
gma-miR166a-5p/c-5p/1	Glyma.19G110700	3,5	17,65	249	269	CUUGGAGUCUGAUACAUUC	Cleavage	(1 of 2) PTHR11122:SF18 - NDH-DEPENDENT CYCLIC ELECTRON FLOW 1	
gma-miR166a-5p/c-5p/1	Glyma.18G121600	3,5	18,49	499	519	CAAUGAGCCAGACGAUGUUCU	Cleavage	(1 of 4) PTHR12300:SF51 - HVA22-LIKE PROTEIN C	
gma-miR166a-5p/c-5p/1	Glyma.06G226700	4	18,04	1509	1529	CCUCGAGCUAGAUGGAAUUUC	Cleavage	(1 of 3) PF00560//PF07714//PF11721//PF13855 - Leucine Rich Repeat (LRR_1) // Protein tyrosine kinase (Pkinase_Tyr) // Di-glucose binding within endoplasmic reticulum (Malectin) // Leucine rich repeat (LRR_8)	
gma-miR166a-5p/c-5p/1	Glyma.13G354800	4	18,37	1194	1214	CCUCAAGGCAGUCAGCAUUC	Translation	(1 of 2) PTHR24078:SF169 - DNAJ HOMOLOG SUBFAMILY C MEMBER 17	
gma-miR166a-5p/c-5p/1	Glyma.02G027800	4	18,51	820	840	CUUCGAUCCGGACAACGCUCU	Cleavage	(1 of 8) 3.4.24.12 - Envelysin / Sea-urchin-hatching proteinase	

gma-miR166a-5p/c-5p/1	Glyma.13G156600	4	18,65	804	824	CCUAGAGUCAGACGAUAUGCC	Cleavage	(1 of 3) PTHR12136//PTHR12136:SF49 - STEROIDOGENIC ACUTE REGULATORY PROTEIN STAR // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR166a-5p/c-5p/1	Glyma.05G070200	3,5	19,27	575	595	CCUUGAGAGAGACAACAUUUC	Cleavage	(1 of 5) PTHR31312:SF2 - TWO-COMPONENT RESPONSE REGULATOR-LIKE APRR2	
gma-miR166a-5p/c-5p/1	Glyma.12G155400	4,5	21,13	1175	1195	UCUUGAGCCAGAGAGUGUUCG	Cleavage	(1 of 4) PTHR24056//PTHR24056:SF204 - CELL DIVISION PROTEIN KINASE // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR166a-5p/c-5p/1	Glyma.15G121200	4,5	21,16	960	980	CCUUAAGCCAGAAAUGUUCU	Cleavage	(1 of 2) PTHR24351//PTHR24351:SF87 - RIBOSOMAL PROTEIN S6 KINASE // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR166a-5p/c-5p/1	Glyma.06G242600	4,5	21,23	1193	1213	UCUUGAGCCAGAGAGUGUUCG	Cleavage	(1 of 4) PTHR24056//PTHR24056:SF204 - CELL DIVISION PROTEIN KINASE // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR2118a-3p/b-3p	Glyma.18G207000	3,5	10,37	83	103	UGGAAUGGAAGGAAUUGGCAA	Cleavage		0
gma-miR2118a-3p/b-3p	Glyma.08G122000	3	12,12	1876	1896	AGGAAGGCGUGGAAUCGGCAC	Cleavage	(1 of 1) PTHR17204:SF18 - PRE-MRNA-PROCESSING FACTOR 39	
gma-miR2118a-3p/b-3p	Glyma.U032700	3	12,36	823	843	UGGAAUGGGUGGAAUAGGAAA	Cleavage	(1 of 58) PTHR11017//PTHR11017:SF155 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR2118a-3p/b-3p	Glyma.09G066800	4,5	15,73	275	296	AGAAAUGGUGUGGAAUUGGCA A	Cleavage	(1 of 4) PTHR10052//PTHR10052:SF11 - 60S RIBOSOMAL PROTEIN L18A // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR2118a-3p/b-3p	Glyma.13G303900	3	17,51	325	345	AGGGAUGGCUGGGAUUGGCAA	Cleavage	(1 of 6) PTHR10891//PTHR10891:SF585 - EF-HAND CALCIUM-BINDING DOMAIN CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR2118a-3p/b-3p	Glyma.13G145900	3	19,49	1305	1325	UGGAGCGGGUGGAAUUGGCGG	Cleavage	(1 of 4) PTHR31683:SF21 - PECTATE LYASE 12-RELATED	

gma-miR2118a-3p/b-3p	Glyma.16G213900	4,5	18,08	2330	2350	GGCAAUGGGUAGAAUCGGAAG	Translation	(1 of 8) PF05729 - NACHT domain (NACHT)	
gma-miR2118a-3p/b-3p	Glyma.16G213900	3,5	19,21	642	662	CGGAAUGGGUGGGAUAGGAAA	Cleavage	(1 of 8) PF05729 - NACHT domain (NACHT)	
gma-miR2118a-3p/b-3p	Glyma.17G228500	3,5	20,81	1197	1217	AGGAAAGGGAGGAGUUGGCAA	Cleavage	(1 of 6) PTHR23264 - NUCLEOTIDE-BINDING PROTEIN NBP35 YEAST - RELATED	
gma-miR2118a-3p/b-3p	Glyma.U008300	3,5	22,83	1121	1141	GGGAAUGGGUGGAUUGGGUAA	Cleavage	(1 of 58) PTHR11017//PTHR11017:SF163 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR2118a-3p/b-3p	Glyma.13G076200	3	24,3	971	991	GGGCAUGGGUGGAAUAGGUAA	Cleavage	(1 of 37) PTHR11017//PTHR11017:SF162 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.02G178400	3	2,812	68	89	CCUUGCCCAUCCUCCCAUCUCA	Cleavage	(1 of 67) PF05553 - Cotton fibre expressed protein (DUF761)	
gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.09G112700	3,5	3,839	73	94	CCUUGUCCAUCCUCCCAUCUC A	Cleavage	(1 of 67) PF05553 - Cotton fibre expressed protein (DUF761)	
gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.05G184700	3,5	4,624	137	158	AUUUCUCCGCCUCCCAUCUC C	Cleavage	(1 of 3) K13628 - iron-sulfur cluster assembly protein (iscA, ISCA1)	
gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.10G092100	3	5,133	163	184	UAUCACCGACUCUCCCAUAUC C	Cleavage	(1 of 2) PTHR22952//PTHR22952:SF204 - CAMP-RESPONSE ELEMENT BINDING PROTEIN-RELATED // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.13G098000	4,5	3,675	584	605	CUUCAUCGACCCUCUUCUCUC U	Cleavage		0
gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.02G176800	3	5,53	214	235	UAUAACCGACUCUCCCAUAUC C	Cleavage	(1 of 2) PTHR22952//PTHR22952:SF204 - CAMP-RESPONSE ELEMENT BINDING PROTEIN-RELATED // SUBFAMILY NOT NAMED	

gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.11G181800	4	4,781	607	628	AUUUAUCGACUCUACCAACUC C	Cleavage		0
gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.03G174000	4,5	4,525	601	623	UUUUAUCGCACCUUUUCAUCU CU	Cleavage		0
gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.10G022900	4	6,699	23	44	CUUUGUCGUCUCUUUCGUCUC C	Cleavage	(1 of 5) K14493 - gibberellin receptor GID1 (GID1)	
gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.03G174000	4,5	6,415	498	520	UUUUAUCGCACCUUUUCAUCU CU	Cleavage		0
gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.16G161500	4,5	6,604	878	898	CUUUAGUGACCCUCC-AUCUCC	Cleavage	(1 of 5) PTHR11200:SF128 - TYPE I INOSITOL 1,4,5-TRISPHOSPHATE 5-PHOSPHATASE 1	
gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.10G013400	3	8,289	72	93	CUCCCCUGACCCUCCAUCUCC	Cleavage	(1 of 3) PTHR15954:SF4 - VACUOLAR PROTEIN SORTING-ASSOCIATED PROTEIN 51 HOMOLOG	
gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.04G014200	4	7,646	2369	2390	GUUUAUUGACUCUCUAAUCUC U	Cleavage		0
gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.02G238500	4,5	7,23	259	280	CUUUAUCUAUCUUCCUUCUC C	Cleavage	(1 of 11) KOG2966 - Uncharacterized conserved protein	
gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.19G010500	4,5	7,706	27	48	UUUUGCUGACUCUUCUCUUUC C	Cleavage	(1 of 2) PF09446 - VMA21-like domain (VMA21)	
gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.05G040800	4	8,5	2460	2481	CUUUACCAACUUUCUAAUUC U	Cleavage	(1 of 1) PTHR23315//PTHR23315:SF130 - BETA CATENIN-RELATED ARMADILLO REPEAT-CONTAINING // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.02G078700	4,5	8,094	1015	1035	CUUUAGUGACCCUCC-AUCUCC	Cleavage	(1 of 5) PTHR11200:SF128 - TYPE I INOSITOL 1,4,5-TRISPHOSPHATE 5-PHOSPHATASE 1	

gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.18G290200	3,5	9,788	791	812	UUUUCCCAACUUUCCAUCUC C	Cleavage	(1 of 4) K03131 - transcription initiation factor TFIID subunit 6 (TAF6)	
gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.10G027300	5	8,756	79	100	CUUUGCUGACCCUCCUUUUU A	Cleavage		0
gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.17G205100	4,5	10,12	432	453	CUUCGCCGACCCUCCUCUCG	Cleavage	(1 of 57) PF01535//PF13041//PF13812 - PPR repeat (PPR) // PPR repeat family (PPR_2) // Pentatricopeptide repeat domain (PPR_3)	
gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.15G057500	4	11,48	292	313	CUUUGCCAACUAUCCCAUCUC U	Translation		0
gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.04G184300	4,5	11,57	1591	1612	CUUUAUUGAUCCUACAUUUU C	Cleavage	(1 of 3) PTHR11132//PTHR11132:SF120 - SOLUTE CARRIER FAMILY 35 // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.02G172200	4	13,08	673	694	CUUAAUCUAUCUCCUAUCUC C	Cleavage	(1 of 3) PTHR27007:SF56 - L-TYPE LECTIN-DOMAIN CONTAINING RECEPTOR KINASE S.5-RELATED	
gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.05G086200	4,5	13,08	434	455	CUUUUCAGACUCUUCUAUCUC A	Cleavage	(1 of 5) PTHR13058 - THREE PRIME REPAIR EXONUCLEASE 1, 2	
gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.08G020800	4	13,62	563	584	UUUUCUCGAUUCUGCCAUCUC C	Cleavage	(1 of 88) PF00069//PF00560//PF08263//PF13855 - Protein kinase domain (Pkinase) // Leucine Rich Repeat (LRR_1) // Leucine rich repeat N-terminal domain (LRRNT_2) // Leucine rich repeat (LRR_8)	
gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.14G087500	4,5	13,61	2934	2955	CUUUACUUGUUCUCUCAUUUU C	Cleavage	(1 of 8) PTHR10795//PTHR10795:SF388 - PROTEIN CONVERTASE SUBTILISIN/KEXIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.02G092400	3,5	14,97	1430	1451	UUUUCCCAACUUUCCAUCUC C	Cleavage	(1 of 4) K03131 - transcription initiation factor TFIID subunit 6 (TAF6)	
gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.14G060200	4	14,62	107	128	CUUUCUCUGCCCUCUCAUCUU C	Cleavage	(1 of 3) PTHR22903 - PLEKHH PROTEIN	

gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.19G105200	4,5	16,6	401	422	CUUUUCAGACUCUUCUAUCUC A	Cleavage	(1 of 5) PTHR13058 - THREE PRIME REPAIR EXONUCLEASE 1, 2	
gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.11G103500	3,5	20,61	237	258	UUUUGUGGUCCUCCCAUCUC C	Cleavage	(1 of 2) 1.3.1.72 - Delta(24)-sterol reductase / Lanosterol Delta(24)-reductase	
gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.12G028300	3,5	22,43	222	243	UUUUGUGGUCCUCCCAUCUC C	Cleavage	(1 of 2) 1.3.1.72 - Delta(24)-sterol reductase / Lanosterol Delta(24)-reductase	
gma-miR2118a-5p/b-5p	Glyma.16G054900	4	24,35	286	307	CUUUGUUCAUCCUCUUAUCUC C	Cleavage	(1 of 23) PF11820 - Protein of unknown function (DUF3339) (DUF3339)	
gma-miR390a-3p/c	Glyma.15G024900	4	12,94	527	546	GGAACGUAGGAAGGAUAGUG	Cleavage	(1 of 2) PTHR37733:SF1 - SMAD/FHA DOMAIN-CONTAINING PROTEIN	
gma-miR390a-3p/c	Glyma.13G356600	3,5	13,74	781	800	GAAAGUCAGUAUGGAUGGUG	Translation	(1 of 4) PTHR31734:SF5 - AUXIN-RESPONSIVE PROTEIN IAA27	
gma-miR390a-3p/c	Glyma.04G150400	3	15,01	1724	1743	AAAGCUCAGGAUGGAAAGCU	Cleavage	(1 of 305) PF00646 - F-box domain (F-box)	
gma-miR390a-3p/c	Glyma.13G348900	4	15,43	1029	1048	GGAACCUAGGAAGGAUAGUG	Cleavage	(1 of 2) PTHR37733:SF1 - SMAD/FHA DOMAIN-CONTAINING PROTEIN	
gma-miR390a-3p/c	Glyma.06G213000	3	16,56	1562	1581	AAAGCUCAGGAUGGAAAGCU	Cleavage		0
gma-miR390a-3p/c	Glyma.10G093100	4,5	15,08	1311	1330	GAAAUUCAGAAUGGAGAGCU	Translation	(1 of 4) PTHR16223:SF29 - TRANSCRIPTION FACTOR BHLH117-RELATED	
gma-miR390a-3p/c	Glyma.04G147000	3,5	16,31	2240	2259	GAAAUUCAGGAUAGAUAGUA	Cleavage	(1 of 5) K14515 - EIN3-binding F-box protein (EBF1_2)	
gma-miR390a-3p/c	Glyma.01G136500	4	18,07	826	845	GAACUUCAGGAUGGAUUGCC	Cleavage	(1 of 3) PTHR10566//PTHR10566:SF85 - CHAPERONE-ACTIVITY OF BC1 COMPLEX CAB1 -RELATED // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR390a-3p/c	Glyma.17G027900	4	18,22	1517	1536	GAAACUCGGGAUGGUUGGUC	Cleavage	(1 of 4) PTHR11206:SF165 - MATE EFFLUX FAMILY PROTEIN	
gma-miR390a-3p/c	Glyma.01G019400	4	19,85	1064	1083	GAAGGUCAGCAUGGAUGGUG	Translation	(1 of 4) PTHR31734:SF24 - AUXIN-RESPONSIVE PROTEIN IAA9	

gma-miR390a-3p/c	Glyma.02G231300	3	20,94	87	106	AAAGCUCAGGAGGGGAUAGCA	Cleavage		0
gma-miR390a-3p/c	Glyma.20G236700	4	20,36	1469	1488	GAGAUUCAGGUUGGAGAGCG	Translation	(1 of 4) PTHR22937//PTHR22937:SF37 - RING FINGER CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR390a-3p/c	Glyma.09G223000	4	20,75	1378	1397	GGGACCCAGGAUGGCUGGCG	Cleavage	(1 of 2) PTHR15572 - GLIOMA TUMOR SUPPRESSOR CANDIDATE REGION GENE 1	
gma-miR390a-3p/c	Glyma.01G098000	4	20,9	597	616	GAAGGUCAGCAUGGAUGGUG	Translation	(1 of 4) PTHR31734:SF24 - AUXIN-RESPONSIVE PROTEIN IAA9	
gma-miR390a-3p/c	Glyma.20G114300	3,5	21,48	594	613	GAGACUCGGGAUGGAAAGCA	Cleavage	(1 of 3) K08827 - serine/threonine-protein kinase PRP4 [EC:2.7.11.1] (PRPF4B)	
gma-miR390a-3p/c	Glyma.09G203300	4	22,25	946	965	GAAGGUCAGCAUGGAUGGUG	Translation	(1 of 4) PTHR31734:SF24 - AUXIN-RESPONSIVE PROTEIN IAA9	
gma-miR390a-3p/c	Glyma.20G103900	4,5	22,35	1261	1280	GAAGUUCGGGGUGAGUGGCG	Cleavage	(1 of 4) PTHR23500:SF47 - SUGAR TRANSPORT PROTEIN 10-RELATED	
gma-miR390a-3p/c	Glyma.02G145400	4	23,15	339	358	GGAAUUCUGGAUGGAUAGUU	Cleavage		0
gma-miR390a-3p/c	Glyma.09G193000	4	24,88	1018	1037	GAAGGUCAGCAUGGAUGGUG	Translation	(1 of 53) K14484 - auxin-responsive protein IAA (IAA)	
gma-miR390a-3p/c	Glyma.16G075000	4,5	24,66	1073	1092	GAAGCUCAGCAUGGAGAGCA	Translation	(1 of 3) KOG4629 - Predicted mechanosensitive ion channel	
gma-miR390a-3p/c	Glyma.10G285100	4,5	24,75	1270	1289	GAAGUUCGGGGUGAGUGGCG	Cleavage	(1 of 4) PTHR23500:SF47 - SUGAR TRANSPORT PROTEIN 10-RELATED	
gma-miR390a-5p/f/g	Glyma.09G032400	3	3,855	614	634	UUGUCUAUCCCUCCUGAGCUG	Cleavage		0
gma-miR390a-5p/f/g	Glyma.09G032400	3	7,547	357	377	GGUGCUAUCCUAUCUGAGCUU	Translation		0
gma-miR390a-5p/f/g	Glyma.05G247300	3,5	9,202	636	656	GGCUCUGUCCCUUUAAAGCUU	Cleavage	(1 of 4) PTHR27008:SF19 - INACTIVE RECEPTOR KINASE RLK902-RELATED	
gma-miR390a-5p/f/g	Glyma.08G055700	3,5	11,71	904	924	GGCUCUGUCCCUUUAAAGCUU	Cleavage	(1 of 4) PTHR27008:SF19 - INACTIVE RECEPTOR KINASE RLK902-RELATED	

gma-miR390a-5p/f/g	Glyma.02G035300	3	15,78	1765	1785	GGAGUUGUCCUUCUUGAGCUU	Cleavage	(1 of 4) PTHR27001:SF36 - PROLINE-RICH RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE PERK12-RELATED
gma-miR390a-5p/f/g	Glyma.03G114700	3,5	16,47	823	843	GGUGUUAGCUUUCUUGAGCUU	Cleavage	(1 of 70) PF03140 - Plant protein of unknown function (DUF247)
gma-miR390a-5p/f/g	Glyma.20G245600	3	17,68	1040	1060	GGUGUUGUUCUUCUUGAGCUU	Cleavage	(1 of 2) PTHR27001:SF115 - PT11-LIKE TYROSINE-PROTEIN KINASE 1-RELATED
gma-miR390a-5p/f/g	Glyma.18G175700	3	19,57	600	620	GGUACCAUCCCUCUUGAGCUU	Cleavage	(1 of 2) PTHR27008:SF28 - KINASE-LIKE PROTEIN TMKL1-RELATED
gma-miR390a-5p/f/g	Glyma.08G357200	3	20,18	481	501	GGUACCAUCCCUCUUGAGCUU	Cleavage	(1 of 2) PTHR27008:SF28 - KINASE-LIKE PROTEIN TMKL1-RELATED
gma-miR390a-5p/f/g	Glyma.13G104300	3	21,46	3829	3849	GGUGUUGUUCUUCUUGAGCUU	Cleavage	(1 of 4) PTHR27001:SF26 - PROTEIN KINASE FAMILY PROTEIN
gma-miR390a-5p/f/g	Glyma.09G063200	4	22,32	3814	3834	GGUGUUGUCCUCCUUGAGCUU	Translation	(1 of 4) PTHR27001:SF26 - PROTEIN KINASE FAMILY PROTEIN
gma-miR390a-5p/f/g	Glyma.20G232500	3,5	24,23	929	949	GGUGCUGGUUCUUCUGAGCUU	Cleavage	(1 of 2) PTHR34661:SF3 - ALPHA-CRYSTALLIN DOMAIN OF HEAT SHOCK PROTEIN-CONTAINING PROTEIN
gma-miR390a-5p/f/g	Glyma.14G033500	3	24,74	906	926	GGUGGAAUCCCUCUGAGUUU	Cleavage	(1 of 4) PTHR27000:SF121 - LEUCINE-RICH REPEAT RECEPTOR-LIKE SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE BAM3
gma-miR395a/b/c	Glyma.15G037100	3	3,564	135	155	GACUCCCCUCAAACACUUUAC	Cleavage	(1 of 118) PF03514 - GRAS domain family (GRAS)
gma-miR395a/b/c	Glyma.10G206400	4,5	9,142	1036	1056	UUUUUCGUCUAAAACUUCAU	Cleavage	(1 of 5) PTHR10641//PTHR10641:SF508 - MYB-LIKE DNA-BINDING PROTEIN MYB // SUBFAMILY NOT NAMED

gma-miR395a/b/c	Glyma.06G106200	3	11,06	240	260	GAGUUCAACCAAACACUUCAA	Cleavage	(1 of 8) K17469 - sulfate transporter 2, low-affinity (SULTR2)
gma-miR395a/b/c	Glyma.11G186200	4	11,73	355	375	GAGUUCUCACAAGCAUUUCAA	Cleavage	(1 of 6) 2.3.1.181 - Lipoyl(octanoyl) transferase / Octanoyl-[acyl-carrier-protein]-protein N-octanoyltransferase
gma-miR395a/b/c	Glyma.17G092800	5	10,95	518	538	AGAAUUCUCCAAACACUCUAG	Cleavage	(1 of 7) PTHR23201//PTHR23201:SF18 - EXTENSIN, PROLINE-RICH PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED
gma-miR395a/b/c	Glyma.15G154200	4	13,23	2833	2853	GAGUUCUUCUAAACAUCUUAG	Cleavage	(1 of 6) PTHR23336:SF14 - CW-TYPE ZINC-FINGER PROTEIN
gma-miR395a/b/c	Glyma.18G099900	4,5	15	341	361	CUGUUUUCUUGAGUGUUUCAG	Cleavage	(1 of 4) K03801 - lipoyl(octanoyl) transferase (lipB)
gma-miR395a/b/c	Glyma.11G238400	5	15,48	722	742	GACUCCUUUGGACUCUUCAG	Cleavage	(1 of 8) K17469 - sulfate transporter 2, low-affinity (SULTR2)
gma-miR395a/b/c	Glyma.20G184200	3	17,51	689	709	AGGUUCCUCAACACUUUGA	Cleavage	(1 of 5) PTHR10641//PTHR10641:SF508 - MYB-LIKE DNA-BINDING PROTEIN MYB // SUBFAMILY NOT NAMED
gma-miR395a/b/c	Glyma.12G045600	3	17,92	821	841	GAGUUUUUCCAGAUUUUCAG	Cleavage	(1 of 19) PF05055 - Protein of unknown function (DUF677) (DUF677)
gma-miR395a/b/c	Glyma.04G034800	4	17,39	845	865	GAGUUCUCACGAGCGUUUCAG	Cleavage	(1 of 4) K03801 - lipoyl(octanoyl) transferase (lipB)
gma-miR395a/b/c	Glyma.18G099900	3	18,44	2495	2515	GAGUUCUCACAAGCAUUUCAG	Cleavage	(1 of 4) K03801 - lipoyl(octanoyl) transferase (lipB)
gma-miR395a/b/c	Glyma.04G085000	4	18,15	2688	2708	GAGUUCUUUUUCCAGAUAAUGCAG	Cleavage	(1 of 12) PF00046//PF01852//PF08670 - Homeobox domain (Homeobox) // START domain (START) // MEKHLA domain (MEKHLA)

gma-miR395a/b/c	Glyma.11G120500	3,5	20,73	749	769	GAAUUCUCCAGAUUUUCAG	Cleavage	(1 of 19) PF05055 - Protein of unknown function (DUF677) (DUF677)
gma-miR395a/b/c	Glyma.10G170800	3,5	21,44	497	517	GAGUUGCCUAAAUAUUUAG	Cleavage	(1 of 3) PTHR12506//PTHR12506:SF25 - PROTEIN PHOSPHATASE RELATED // SUBFAMILY NOT NAMED
gma-miR395a/b/c	Glyma.06G086600	4	21,57	2676	2696	GAGUCCCCCAGAUAAUGCAG	Cleavage	(1 of 12) PF00046//PF01852//PF08670 - Homeobox domain (Homeobox) // START domain (START) // MEKHLA domain (MEKHLA)
gma-miR395a/b/c	Glyma.20G219100	3,5	23,07	763	783	GAGUUGCCUAAAUAUUUAG	Cleavage	(1 of 1) PTHR12506//PTHR12506:SF21 - PROTEIN PHOSPHATASE RELATED // SUBFAMILY NOT NAMED
gma-miR396i-3p	Glyma.12G179800	3,5	9,956	2116	2136	CUUCCCCUAGUUUAAUUGAAC	Cleavage	(1 of 6) PTHR13683:SF348 - ASPARTYL PROTEASE FAMILY PROTEIN
gma-miR396i-3p	Glyma.04G031300	4	10,06	560	580	CUUCUCAAGUUUUUUUUAAU	Cleavage	(1 of 22) PTHR24078:SF177 - PROTEIN DNJ-23-RELATED
gma-miR396i-3p	Glyma.20G054000	4	12,67	2956	2976	UUUCCCACAUUUUUAGUGAGC	Cleavage	(1 of 8) PTHR11771:SF42 - PROTEIN C13C4.7
gma-miR396i-3p	Glyma.11G098700	3,5	13,7	1185	1205	UUUGCCAUAAACUUUGUUGAAC	Cleavage	(1 of 3) PTHR11071:SF264 - PEPTIDYL-PROLYL CIS-TRANS ISOMERASE CYP19-1
gma-miR396i-3p	Glyma.13G316400	3	14,35	879	899	CGUUCUACAGUUUUGUUGGAU	Cleavage	(1 of 5) K02865 - large subunit ribosomal protein L10Ae (RP-L10Ae, RPL10A)
gma-miR396i-3p	Glyma.12G002300	3,5	14,41	2048	2068	CUUCCACACUUUUGUUGAGC	Cleavage	(1 of 2) K15192 - TATA-binding protein-associated factor [EC:3.6.4.-] (BTAF1, MOT1)
gma-miR396i-3p	Glyma.18G045100	4,5	13,46	2547	2567	CUUUUCACACCUUGAUUGAAU	Cleavage	(1 of 4) 1.5.3.16//1.5.3.17 - Spermine oxidase / SMO // Non-specific polyamine oxidase / Polyamine oxidase

gma-miR396i-3p	Glyma.19G115000	4	14,43	1712	1732	UUUCACACAGCUUUGUUGAUG	Cleavage	(1 of 40) PF08263//PF13855 - Leucine rich repeat N-terminal domain (LRRNT_2) // Leucine rich repeat (LRR_8)	
gma-miR396i-3p	Glyma.12G184900	3	15,46	891	911	CGUUCUACAGUUUUGUUGGAU	Cleavage	(1 of 5) K02865 - large subunit ribosomal protein L10Ae (RP-L10Ae, RPL10A)	
gma-miR396i-3p	Glyma.06G270700	3	16,16	449	469	AGGUCCACGGCUUUGUUGAAU	Cleavage		0
gma-miR396i-3p	Glyma.09G234400	3,5	15,95	2059	2079	CUUCCACACUUUUGUUGAGC	Cleavage	(1 of 2) K15192 - TATA-binding protein-associated factor [EC:3.6.4.-] (BTAF1, MOT1)	
gma-miR396i-3p	Glyma.02G198100	3	16,65	2514	2534	UGACCCACAGUUUUAUUCAAC	Cleavage	(1 of 5) PF09758 - Uncharacterised conserved protein (FPL)	
gma-miR396i-3p	Glyma.20G177800	5	15,28	1394	1414	CUUCCACAGUUUCAUUGACA	Cleavage	(1 of 2) PTHR24089:SF300 - MITOCHONDRIAL SUBSTRATE CARRIER FAMILY PROTEIN C	
gma-miR396i-3p	Glyma.11G118300	3	17,46	1610	1630	UUUCCAUGGGUUUAUUGAAC	Translation	(1 of 2) K17261 - adenylyl cyclase-associated protein (CAP1_2, SRV2)	
gma-miR396i-3p	Glyma.10G076200	3,5	16,99	1017	1037	AUCCACGGAUUAUUGAAC	Translation	(1 of 6) PTHR11200:SF174 - POLYPHOSPHATE 5'-PHOSPHATASE-RELATED	
gma-miR396i-3p	Glyma.12G043700	3	17,52	1705	1725	UUUCCAUGGGUUUAUUGAAC	Translation	(1 of 2) K17261 - adenylyl cyclase-associated protein (CAP1_2, SRV2)	
gma-miR396i-3p	Glyma.10G213200	5	15,75	1487	1507	CUUCCACAGUUUCAUUGACA	Cleavage	(1 of 2) PTHR24089:SF300 - MITOCHONDRIAL SUBSTRATE CARRIER FAMILY PROTEIN C	
gma-miR396i-3p	Glyma.11G242400	4,5	16,29	358	378	CUUUCUAUGGUUUGUUGGAG	Cleavage		0

gma-miR396i-3p	Glyma.03G117000	3	18,59	601	621	GUUCCAUGGCCUUUGUUGAAG	Cleavage	(1 of 135) PF00892 - EamA-like transporter family (EamA)	
gma-miR396i-3p	Glyma.15G160800	4	18,07	667	687	CUUCCUAUGUUUUUAUUGAGC	Cleavage	(1 of 70) PF03140 - Plant protein of unknown function (DUF247)	
gma-miR396i-3p	Glyma.04G023600	4	19,93	3773	3793	UUUCCUGUAGCUUUUAUAGAAA	Cleavage	(1 of 4) PTHR15141//PTHR15141:SF48 - TRANSCRIPTION ELONGATION FACTOR B POLYPEPTIDE 3 // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR396i-3p	Glyma.14G221300	4,5	20,34	774	794	CUUUUCACAGCAUUGUUGGGU	Translation	(1 of 19) PF05055 - Protein of unknown function (DUF677) (DUF677)	
gma-miR396i-3p	Glyma.18G014700	4,5	21,43	546	566	CUUUCUAUGGUUUUGUUGGAA	Cleavage		0
gma-miR396i-3p	Glyma.20G043400	4	21,98	521	542	UUUCCACAGCUUCUAUUGAA U	Cleavage	(1 of 7) K16296 - serine carboxypeptidase-like clade I [EC:3.4.16.-] (SCPL-I)	
gma-miR408a-5p/c-5p	Glyma.10G129500	3,5	9,32	528	548	CGUCCUUUGCUUGUUUUUCUG	Cleavage		0
gma-miR408a-5p/c-5p	Glyma.10G227700	3,5	9,75	173	193	CAUGCUUUGCCUCUUCUCCUU	Cleavage	(1 of 30) K01183 - chitinase (E3.2.1.14)	
gma-miR408a-5p/c-5p	Glyma.04G217600	4	10,1	110	130	CAUCCUCUGCCUCUUCUCCUC	Cleavage		0
gma-miR408a-5p/c-5p	Glyma.13G273500	4	10,75	1102	1122	CAUGCUUUGCCUGUUAUCUUU	Cleavage	(1 of 1) PTHR21330:SF2 - E3 SUMO-PROTEIN LIGASE MMS21	
gma-miR408a-5p/c-5p	Glyma.06G148200	4	11,56	104	124	CAUCCUCUGCCUCUUCUCCUC	Cleavage		0

gma-miR408a-5p/c-5p	Glyma.06G114200	3,5	12,96	239	259	CAAGCUCUGCUUCUCCCUUG	Cleavage	(1 of 5) PTHR13683:SF316 - ASPARTYL PROTEASE FAMILY PROTEIN-RELATED	
gma-miR408a-5p/c-5p	Glyma.04G248700	3,5	13,15	254	274	CAAGCUCUGCUUCUCCCUUG	Cleavage	(1 of 5) PTHR13683:SF316 - ASPARTYL PROTEASE FAMILY PROTEIN-RELATED	
gma-miR408a-5p/c-5p	Glyma.15G196400	3	14,08	726	746	AAUUUUCUGUUUGUCCUCUG	Cleavage	(1 of 2) PTHR12210:SF71 - SCP1-LIKE SMALL PHOSPHATASE 4-RELATED	
gma-miR408a-5p/c-5p	Glyma.10G089000	3	15,24	899	919	AGUGCUCUGUCUUUCUCUG	Cleavage	(1 of 23) K06966 - uncharacterized protein (K06966)	
gma-miR408a-5p/c-5p	Glyma.03G068900	3,5	14,91	500	520	UGUGCUUUGAUUGUUCUUCUG	Cleavage	(1 of 2) K18633 - mitotic-spindle organizing protein 1 (MZT1, GIP1, GIP2)	
gma-miR408a-5p/c-5p	Glyma.20G164600	3,5	15,13	461	481	CAUGC UUUGCCUCUUCUCCUU	Cleavage	(1 of 30) K01183 - chitinase (E3.2.1.14)	
gma-miR408a-5p/c-5p	Glyma.20G170000	4	15,91	2296	2316	CAUGCUCUGUCUGUUCUUAU	Cleavage	(1 of 3) K12124 - GIGANTEA (GI)	
gma-miR408a-5p/c-5p	Glyma.09G088300	3	17,12	449	469	AAUUUUCUGUUUGUCCUCUG	Cleavage	(1 of 2) PTHR12210:SF71 - SCP1-LIKE SMALL PHOSPHATASE 4-RELATED	
gma-miR408a-5p/c-5p	Glyma.18G001400	3	17,33	1129	1149	AUCUCUUUGCCUGUCCCUUG	Cleavage	(1 of 1) PTHR11141//PTHR11141:SF4 - PROTEIN TRANSPORT PROTEIN SEC23 // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR408a-5p/c-5p	Glyma.20G095900	4	17,33	294	314	CAUGCUCUGCUUCUUCUUCU	Cleavage		0
gma-miR408a-5p/c-5p	Glyma.19G154700	3	18,44	587	607	UCUGUUCUGUUUGUCCCUU	Cleavage		0

gma-miR408a-5p/c-5p	Glyma.11G099300	4	17,56	804	824	UAUGUUCUGCUUCUUCUUUUG	Cleavage	(1 of 2) PF16320 - Ribosomal protein L7/L12 dimerisation domain (Ribosomal_L12_N)	
gma-miR408a-5p/c-5p	Glyma.13G019900	3,5	18,97	448	468	CAGGCUCUGCCUGUUGCUUUG	Cleavage		0
gma-miR408a-5p/c-5p	Glyma.13G014200	3,5	18,97	448	468	CAGGCUCUGCCUGUUGCUUUG	Cleavage		0
gma-miR408a-5p/c-5p	Glyma.13G013900	3,5	18,97	448	468	CAGGCUCUGCCUGUUGCUUUG	Cleavage		0
gma-miR408a-5p/c-5p	Glyma.02G226300	3	19,82	1899	1919	CAUUCUUGGCUUGUCCCCUG	Cleavage	(1 of 2) K10140 - DNA damage-binding protein 2 (DDB2)	
gma-miR408a-5p/c-5p	Glyma.13G014700	3,5	19,74	448	468	CAGGCUCUGCCUGUUGCUUUG	Cleavage		0
gma-miR408a-5p/c-5p	Glyma.06G205100	5	19,63	274	294	CAUGUUCUGCCUGUUUUUUUUAU	Cleavage	(1 of 58) PTHR11017//PTHR11017:SF155 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR408a-5p/c-5p	Glyma.13G012500	3,5	21,52	151	171	CAGGCUCUGCCUGUUGCUUUG	Cleavage		0
gma-miR408a-5p/c-5p	Glyma.13G016700	3,5	21,52	256	276	CAGGCUCUGCCUGUUGCUUUG	Cleavage		0
gma-miR408a-5p/c-5p	Glyma.06G083000	3,5	24,69	613	633	UAUGCUGUGGUUGUCCUCUG	Cleavage	(1 of 5) PTHR17630:SF54 - ALPHA/BETA-HYDROLASES SUPERFAMILY PROTEIN	
gma-miR482b-3p/d-3p	Glyma.12G229800	4,5	8,686	540	562	GGUUUGUGGAGGUAUAGGGAA GA	Translation		0

gma-miR482b-3p/d-3p	Glyma.08G245900	4,5	11,22	471	493	GGUUUGUGGAGGUAAUAGGGAA GA	Translation		0
gma-miR482b-3p/d-3p	Glyma.06G215300	4,5	12,49	198	220	GGUUUGUGGAGGUAAUAGGGAA GA	Translation		0
gma-miR482b-3p/d-3p	Glyma.07G191200	3	15,11	2117	2138	CUUAUGCGAGGUGUAGUGAAG G	Cleavage	(1 of 12) K17871 - NADH:ubiquinone reductase (non-electrogenic) (ndh1)	
gma-miR482b-3p/d-3p	Glyma.12G218500	3,5	14,75	759	780	GGAAUGGGAGGAGUGGGGAAA A	Translation	(1 of 1) PTHR23155:SF442 - PH DOMAIN LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN PHOSPHATASE 2	
gma-miR482b-3p/d-3p	Glyma.04G153900	4,5	14,23	904	925	GGUUUGGGGGUGGGGGGAGG G	Cleavage		0
gma-miR482b-3p/d-3p	Glyma.18G255900	3	18,16	488	509	GUUGUUGGAGGUGUAGGAAAG A	Cleavage	(1 of 7) PF04431 - Pectate lyase, N terminus (Pec_lyase_N)	
gma-miR482b-3p/d-3p	Glyma.15G270200	3	20,43	768	789	UGUUUGGGAGGGGUGGGGAAG A	Translation	(1 of 2) PTHR21091:SF16 - SIROHEME SYNTHASE	
gma-miR482b-3p/d-3p	Glyma.13G030800	3	20,65	322	343	CUUAUGUGGGGUGUAGUGAAG A	Cleavage	(1 of 24) 1.6.5.9 - NADH:ubiquinone reductase (non-electrogenic) / Ubiquinone reductase	
gma-miR482b-3p/d-3p	Glyma.18G234500	3	20,91	166	187	GGGAUAGGGGUGUAGGAAAG A	Cleavage	(1 of 1) KOG0462 - Elongation factor-type GTP-binding protein	
gma-miR482b-3p/d-3p	Glyma.11G008100	4,5	21,05	2	23	GGUCUGGGAGGUGAAGGAGAG A	Cleavage	(1 of 1) K15175 - parafibromin (CDC73)	
gma-miR482b-3p/d-3p	Glyma.15G071500	4,5	21,61	454	475	GGUAUUGGAGGCUUGGGGAAG A	Translation	(1 of 34) PTHR23155//PTHR23155:SF563 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	

gma-miR482b-3p/d-3p	Glyma.19G138300	4	22,33	641	662	GGUAUUGGAGGCCUUAGGGAAG A	Translation	(1 of 34) PTHR23155//PTHR23155:SF563 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED
gma-miR482b-3p/d-3p	Glyma.19G139700	4,5	23,4	724	745	GGUAUUGGAGGGUUGGGGAAG A	Translation	(1 of 34) PTHR23155//PTHR23155:SF563 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED
gma-miR482b-3p/d-3p	Glyma.18G287100	4,5	24,91	823	844	GGUAUGGGUGGUUUGGGUAAG A	Translation	(1 of 19) PTHR23155:SF402 - DISEASE RESISTANCE PROTEIN RPP13-RELATED
gma-miR482e	Glyma.07G076400	3,5	0,794	7	27	UUCUUUCCUAAUCUUUCAUG	Cleavage	(1 of 17) PTHR32246:SF20 - BON1-ASSOCIATED PROTEIN 1-RELATED
gma-miR482e	Glyma.08G043300	3,5	3,609	37	57	UUCUGUCUAAUCUCCCAUA	Cleavage	(1 of 4) PTHR11886:SF39 - DYNEIN LIGHT CHAIN TYPE 1-LIKE PROTEIN
gma-miR482e	Glyma.08G106800	3	4,8	37	57	UCCCUUCCAUUCCCUUCAUA	Translation	(1 of 3) K02965 - small subunit ribosomal protein S19 (RP-S19, rpsS)
gma-miR482e	Glyma.09G171100	3,5	4,417	82	102	UUCUUUCCAUUCCCUUUAUA	Translation	(1 of 6) PTHR31496:SF7 - TRANSCRIPTION REPRESSOR KAN1-RELATED
gma-miR482e	Glyma.18G260900	4	5,373	118	138	UCCCUUCCAAUUUCCUCCUC	Cleavage	(1 of 79) PF01357 - Pollen allergen (Pollen_allerg_1)
gma-miR482e	Glyma.01G018700	3	6,675	1148	1168	UUGCUUCCUAAUCCUCCCAUU	Cleavage	(1 of 75) PF05678 - VQ motif (VQ)
gma-miR482e	Glyma.05G235900	3,5	6,57	355	375	UUCUGUCUAAUCUCCCAUA	Cleavage	(1 of 4) PTHR11886:SF39 - DYNEIN LIGHT CHAIN TYPE 1-LIKE PROTEIN
gma-miR482e	Glyma.16G193800	4	6,218	117	137	UCCCUUCCAAUCCCAUGUU	Cleavage	(1 of 22) PTHR33044:SF21 - PROTEIN YLS3

gma-miR482e	Glyma.01G185400	3,5	7,734	333	353	UUCCUUUCCAAUCCGCCCCUA	Cleavage	(1 of 4) PTHR10265:SF25 - CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR 6	
gma-miR482e	Glyma.19G228100	3,5	8,206	176	196	UUCCUUCUCGAUUCUCCAUAU	Cleavage	(1 of 2) PTHR13833:SF49 - NHL REPEAT-CONTAINING PROTEIN 2	
gma-miR482e	Glyma.08G102600	4	7,737	153	173	UUCCUUUCUAAUCCCCUCUUU	Cleavage	(1 of 5) K08818 - cell division cycle 2-like [EC:2.7.11.22] (CDC2L)	
gma-miR482e	Glyma.18G243800	3	8,858	16	36	UUUCAUCUCAAUUCCUCAUA	Cleavage	(1 of 1) PTHR33510:SF1 - PROTEIN TIC 20-II, CHLOROPLASTIC	
gma-miR482e	Glyma.15G100500	3,5	9,89	48	68	UUUCUUUCUAAUUCUCCAUG	Cleavage	(1 of 2) KOG1003//KOG2991//KOG4172 - Actin filament-coating protein tropomyosin // Splicing regulator // Predicted E3 ubiquitin ligase	
gma-miR482e	Glyma.13G171500	4	9,646	92	112	UUUCUUCUCAUCCCCCCCCUA	Translation		0
gma-miR482e	Glyma.02G103900	3	10,7	19	39	UUUCUUCGCAAUCCUUCUAUA	Cleavage	(1 of 5) PTHR24012:SF349 - POLYADENYLATE-BINDING PROTEIN 2-RELATED	
gma-miR482e	Glyma.09G236200	4	10,3	199	219	UUCCUCCCAAUUUCCUCCUC	Cleavage	(1 of 79) PF01357 - Pollen allergen (Pollen_allerg_1)	
gma-miR482e	Glyma.12G181700	4	10,69	206	226	UUUCUCCUAGUUUCCUCAUC	Cleavage	(1 of 4) PTHR33285:SF2 - PHYTOSULFOKINES 6-RELATED	
gma-miR482e	Glyma.07G045700	3,5	12,1	810	830	UUUCUUUCAAUCUGCCCAUA	Cleavage		0
gma-miR482e	Glyma.01G169100	3	13,01	2282	2302	AUUCUCCUAAUUCUCCAUG	Cleavage	(1 of 7) PF05277 - Protein of unknown function (DUF726) (DUF726)	
gma-miR482e	Glyma.03G146000	3,5	12,56	28	48	UCCUCCCCAAUCCUCCAAA	Cleavage	(1 of 2) PTHR10438:SF283 - THIOREDOXIN-LIKE 3-1, CHLOROPLASTIC	

gma-miR482e	Glyma.11G143000	4	12,13	764	784	UUCCUUUCCAAGCCUCCCAUU	Translation	(1 of 3) K10703 - very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase (PHS1, PAS2)	
gma-miR482e	Glyma.11G001200	3	13,14	1186	1206	UUUAAUUCCAAUCCCUCCAUG	Cleavage	(1 of 11) PTHR27001:SF1 - BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1-RELATED	
gma-miR482e	Glyma.06G102800	3,5	13,93	1063	1083	UUUUUUCCUAAUCUUCUUAUA	Cleavage	(1 of 4) PTHR18929//PTHR18929:SF113 - PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR482e	Glyma.01G243200	3,5	16,2	1019	1039	UUUAAUUCCAAUCCCUCCGUG	Cleavage	(1 of 80) 2.7.10.1//2.7.11.1 - Receptor protein-tyrosine kinase / Receptor protein tyrosine kinase // Non-specific serine/threonine protein kinase / Threonine-specific protein kinase	
gma-miR482e	Glyma.02G213000	4,5	15,34	777	797	UUCCUCCCAAUCCUCCAAAC	Cleavage	(1 of 4) PTHR13683:SF259 - ASPARTYL PROTEASE-LIKE PROTEIN	
gma-miR482e	Glyma.08G350100	3,5	17,57	460	480	UUGCUUCUCGAUCCCCUCAUU	Cleavage		0
gma-miR482e	Glyma.13G122200	3,5	24,97	1165	1185	UUCUUUCCCAAUUUCUCUGUG	Cleavage	(1 of 4) K17907 - autophagy-related protein 9 (ATG9)	
gma-miR5372	Glyma.06G127900	3	10,57	1212	1232	GUAAAUAGUUUUGUUGAAUAA	Cleavage	(1 of 2) PTHR31717:SF2 - CCT MOTIF FAMILY PROTEIN	
gma-miR5372	Glyma.06G119700	3,5	10,49	1693	1712	GACAACAGUUUU-UUGAACAA	Cleavage	(1 of 3) PTHR13856:SF95 - F24J8.3 PROTEIN	
gma-miR5372	Glyma.13G344200	3	11,14	1131	1151	UAUGGCAGUUUUUAUCGACCAA	Cleavage	(1 of 1) PTHR10891:SF578 - CALMODULIN-LIKE PROTEIN 4-RELATED	
gma-miR5372	Glyma.03G047700	4	10,71	1257	1277	CAUAAAAGUUUUUAUUGAAAGA	Cleavage	(1 of 15) PF00931//PF01582 - NB-ARC domain (NB-ARC) // TIR domain (TIR)	

gma-miR5372	Glyma.09G166600	4	11,13	1509	1529	UAU AACAGUUUUUUUUU AACAA	Cleavage	(1 of 13) PTHR24015:SF419 - NUCLEOTIDE-DIPHOSPHO-SUGAR TRANSFERASE DOMAIN-CONTAINING PROTEIN-RELATED
gma-miR5372	Glyma.10G270100	3,5	11,8	126	146	CGCAACAGUUCUAUCGUAAUAA	Translation	(1 of 7) PTHR10165:SF80 - LIPID PHOSPHATE PHOSPHATASE 1-RELATED
gma-miR5372	Glyma.08G097400	3	12,41	937	957	AACAAUAGUCUUAUUGGACAA	Cleavage	(1 of 62) PF00560//PF13855 - Leucine Rich Repeat (LRR_1) // Leucine rich repeat (LRR_8)
gma-miR5372	Glyma.11G256400	4	11,69	436	456	CACGACAUUUUUAAUUGGACAA	Cleavage	(1 of 2) KOG4411 - Phytoene/squalene synthetase
gma-miR5372	Glyma.03G048700	4	11,9	1374	1394	CAUAAAAGUUUUAAUUGAAAGA	Cleavage	(1 of 58) PTHR11017//PTHR11017:SF163 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED
gma-miR5372	Glyma.11G015600	4,5	12,03	1288	1308	CACAACAGAUUUUAUCUGACAU	Cleavage	(1 of 9) PF00076//PF00642 - RNA recognition motif. (a.k.a. RRM, RBD, or RNP domain) (RRM_1) // Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type (and similar) (zf-CCCH)
gma-miR5372	Glyma.11G018700	3,5	13,06	4061	4081	AACGAUAGUUUUAAUUGGAGAA	Cleavage	(1 of 1) KOG0647 - mRNA export protein (contains WD40 repeats)
gma-miR5372	Glyma.03G047400	4	12,56	624	644	CAUAAAAGUUUUAAUUGAAAGA	Cleavage	(1 of 1) PF00931//PF07727 - NB-ARC domain (NB-ARC) // Reverse transcriptase (RNA-dependent DNA polymerase) (RVT_2)
gma-miR5372	Glyma.06G304800	3	14,42	247	267	UUGUACAGUUUUUAUCGGACAG	Cleavage	(1 of 70) PF03140 - Plant protein of unknown function (DUF247)
gma-miR5372	Glyma.13G278500	4	13,91	835	855	CAUGGUGCUUUUAUUGAACAA	Cleavage	(1 of 2) K14537 - nuclear GTP-binding protein (NUG2, GNL2)
gma-miR5372	Glyma.12G223000	4	14,52	829	849	CAUGGUGCUUUUAUUGAACAA	Cleavage	(1 of 2) K14537 - nuclear GTP-binding protein (NUG2, GNL2)

gma-miR5372	Glyma.19G039100	3,5	15,48	955	975	AAU AACAGUUUUGAUGGACAA	Cleavage	(1 of 4) PTHR27001:SF217 - PROTEIN NSP-INTERACTING KINASE 1
gma-miR5372	Glyma.13G040600	4	15,94	835	855	CACAACAGUUUUGUGCAAUAA	Cleavage	(1 of 3) PF06017 - Unconventional myosin tail, actin- and lipid-binding (Myosin_TH1)
gma-miR5372	Glyma.02G102500	3	17,17	1642	1662	GAUGACCGUUUUAUUGAGCAA	Cleavage	(1 of 5) PF01936//PF12872 - NYN domain (NYN) // OST-HTH/LOTUS domain (OST-HTH)
gma-miR5372	Glyma.11G123500	3	17,22	1571	1591	GAUAACAGUUUUGAUUGGACAA	Translation	(1 of 1) K08873 - PI-3-kinase-related kinase SMG-1 (SMG1)
gma-miR5372	Glyma.02G144600	3,5	16,79	2960	2980	CGCAGCAGUUUUGAUGGACAA	Cleavage	(1 of 4) PTHR23083//PTHR23083:SF430 - TETRATRICOPEPTIDE REPEAT PROTEIN, TPR // SUBFAMILY NOT NAMED
gma-miR5372	Glyma.09G023000	3	18,76	388	408	CGCAUCAAUUUUGUUGAACAA	Cleavage	(1 of 14) PTHR31388:SF22 - PEROXIDASE 22-RELATED
gma-miR5372	Glyma.16G195800	3	20,42	380	400	UGCACCAGUUUUAUUGGCAG	Cleavage	(1 of 4) 1.14.13.102 - Psoralen synthase
gma-miR5372	Glyma.13G272900	3,5	21,29	1027	1047	UACAGCUGUUUUAUUGAAAAA	Cleavage	(1 of 2) 1.3.1.27 - 2-hexadecenal reductase / 2-alkenal reductase
gma-miR5372	Glyma.12G227400	3,5	21,44	1074	1094	UACAGCUGUUUUAUUGAAAAA	Cleavage	(1 of 2) 1.3.1.27 - 2-hexadecenal reductase / 2-alkenal reductase
gma-miR5374-3p	Glyma.06G001100	3	6,544	3628	3648	CUUUGUAAUUAGAUUUUGAA	Translation	(1 of 2) PTHR11777:SF14 - ALANINE--TRNA LIGASE, CHLOROPLASTIC-RELATED
gma-miR5374-3p	Glyma.10G147400	3,5	9,335	119	139	UUUUAAAUCUGACAUUUGUC	Cleavage	0

gma-miR5374-3p	Glyma.03G263900	3,5	12,1	772	792	UUUUUUAAUCUGUCAUUUGAU	Cleavage	(1 of 9) PTHR22835:SF262 - GDSE ESTERASE/LIPASE 5-RELATED	
gma-miR5374-3p	Glyma.01G237900	4	12,44	660	681	AUUUAUAAUACUGAUUUUGA G	Cleavage	(1 of 6) PTHR10314//PTHR10314:SF101 - SER/THR DEHYDRATASE, TRP SYNTHASE // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR5374-3p	Glyma.04G086700	3	13,71	1989	2009	UUUAAUAAUCUCGCAUUUGAA	Translation	(1 of 88) PF00069//PF00560//PF08263//PF13855 - Protein kinase domain (Pkinase) // Leucine Rich Repeat (LRR_1) // Leucine rich repeat N- terminal domain (LRRNT_2) // Leucine rich repeat (LRR_8)	
gma-miR5374-3p	Glyma.02G005400	3,5	13,37	866	886	UUUUCUAAUUUGACAUUUGGA	Cleavage	(1 of 67) PF05553 - Cotton fibre expressed protein (DUF761)	
gma-miR5374-3p	Glyma.11G015700	4	12,87	2234	2254	UUUUAUAGUUUGUUGUUUGAG	Cleavage	(1 of 3) K12392 - AP-1 complex subunit beta-1 (AP1B1)	
gma-miR5374-3p	Glyma.05G235400	3,5	14,08	109	129	UUUUCUGAUCUGUCAUUUGAG	Cleavage	(1 of 2) K14011 - UBX domain-containing protein 6 (UBXN6, UBXD1)	
gma-miR5374-3p	Glyma.13G205300	3,5	14,23	1894	1914	UUUUGUAAUCAUACAUUUGAA	Translation		0
gma-miR5374-3p	Glyma.01G227000	4	13,88	2232	2252	UUUUAUAGUUUGUUGUUUGAG	Cleavage	(1 of 3) K12392 - AP-1 complex subunit beta-1 (AP1B1)	
gma-miR5374-3p	Glyma.01G109400	4	14,08	604	624	UUUUGUAGUCUUGCAUUUGAU	Translation	(1 of 41) PTHR23272//PTHR23272:SF0 - BED FINGER-RELATED // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR5374-3p	Glyma.U032300	3	15,33	1143	1163	GUUUGUGAUCAGAUUUUGAA	Translation	(1 of 9) PTHR12542:SF41 - EXOCYST SUBUNIT EXO70 FAMILY PROTEIN A3- RELATED	
gma-miR5374-3p	Glyma.18G155800	3,5	14,91	441	461	UUUUUUGAUUUUACAUUUGAA	Translation		0

gma-miR5374-3p	Glyma.04G179000	4	15,12	802	822	UUUUGUAGUCUUGCAUUUGAU	Translation	(1 of 41) PTHR23272//PTHR23272:SF0 - BED FINGER-RELATED // SUBFAMILY NOT NAMED
gma-miR5374-3p	Glyma.20G072700	3	16,16	304	324	GUUUGUGAUCAGAUUUUGAA	Translation	(1 of 9) PTHR12542:SF41 - EXOCYST SUBUNIT EXO70 FAMILY PROTEIN A3-RELATED
gma-miR5374-3p	Glyma.17G175200	4	15,4	682	702	UUUUGUAGUCUUGCAUUUGAU	Translation	(1 of 41) PTHR23272//PTHR23272:SF0 - BED FINGER-RELATED // SUBFAMILY NOT NAMED
gma-miR5374-3p	Glyma.14G154700	4	15,4	544	564	UUUUGUAGUCUUGCAUUUGAU	Translation	(1 of 41) PTHR23272//PTHR23272:SF0 - BED FINGER-RELATED // SUBFAMILY NOT NAMED
gma-miR5374-3p	Glyma.16G027700	3,5	16,51	1116	1136	UUUUGUAAUUUUUAUUUGGA	Translation	(1 of 2) PTHR23416:SF2 - SERINE ACETYLTRANSFERASE 5
gma-miR5374-3p	Glyma.20G237600	4	16,31	499	519	UUUUGUAGUCUUGCAUUUGAU	Translation	(1 of 41) PTHR23272//PTHR23272:SF0 - BED FINGER-RELATED // SUBFAMILY NOT NAMED
gma-miR5374-3p	Glyma.15G148600	4	16,71	886	906	UUUUGUAGUCUUGCAUUUGAU	Translation	(1 of 41) PTHR23272//PTHR23272:SF0 - BED FINGER-RELATED // SUBFAMILY NOT NAMED
gma-miR5374-3p	Glyma.12G023200	3,5	17,58	576	596	CUUUGUGAUUUGAUUUUGGU	Cleavage	(1 of 3) PTHR31852:SF8 - LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT HYDROXYPROLINE-RICH GLYCOPROTEIN
gma-miR5374-3p	Glyma.08G263600	4	17,28	592	612	UUUUGUAGUCUUGCAUUUGAU	Translation	(1 of 41) PTHR23272//PTHR23272:SF0 - BED FINGER-RELATED // SUBFAMILY NOT NAMED
gma-miR5374-3p	Glyma.10G196100	3	18,29	1084	1104	GUUUGUGAUCAGAUUUUGAA	Translation	(1 of 9) PTHR12542:SF41 - EXOCYST SUBUNIT EXO70 FAMILY PROTEIN A3-RELATED
gma-miR5374-3p	Glyma.04G120300	4	17,66	748	768	UUUUGUAGUCUUGCAUUUGAU	Translation	(1 of 41) PTHR23272//PTHR23272:SF0 - BED FINGER-RELATED // SUBFAMILY NOT NAMED

gma-miR5374-3p	Glyma.20G194100	3	19,01	1173	1193	GUUUGUGAUCAGAUUUUGAA	Translation	(1 of 9) PTHR12542:SF41 - EXOCYST SUBUNIT EXO70 FAMILY PROTEIN A3-RELATED	
gma-miR5374-5p	Glyma.07G153100	3	11,19	2053	2073	ACUUCAGAUGUCGGCCUAUGA	Cleavage	(1 of 3) PTHR18968:SF137 - PYRUVATE DECARBOXYLASE 2	
gma-miR5374-5p	Glyma.15G001000	5	11,85	20	40	AUCCAGAUGUCAUUAUUGUUG	Cleavage		0
gma-miR5374-5p	Glyma.02G261700	3	14,62	886	906	AUUCAAGAUGUCGGACUAGAA	Cleavage	(1 of 8) PTHR31241:SF2 - DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN 2A-RELATED	
gma-miR5374-5p	Glyma.19G019600	5	12,98	98	118	AUCCAGAUGUCAUUAUUGUUG	Cleavage		0
gma-miR5374-5p	Glyma.13G372900	5	13,14	70	90	AUCCAGAUGUCAUUAUUGUUG	Cleavage	(1 of 5) PF12576 - Protein of unknown function (DUF3754) (DUF3754)	
gma-miR5374-5p	Glyma.15G051700	3,5	14,67	1463	1483	GUUUUAGAUGUCAAAUUAUGA	Cleavage	(1 of 4) K14298 - mRNA export factor (RAE1, GLE2)	
gma-miR5374-5p	Glyma.14G056200	3,5	15,26	938	958	AUUCUAGAUGUCAGACCAGAA	Cleavage	(1 of 8) PTHR31241:SF2 - DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN 2A-RELATED	
gma-miR5374-5p	Glyma.01G228600	4,5	14,62	655	675	AUCCAGAUUAUGAACUAUGA	Cleavage	(1 of 2) PTHR10741:SF5 - TRANSLIN-ASSOCIATED PROTEIN X	
gma-miR5374-5p	Glyma.14G095500	3,5	16,3	1595	1615	UUUGCAGAUUUCAGACUAUAC	Cleavage	(1 of 2) PTHR10992//PTHR10992:SF853 - ALPHA/BETA HYDROLASE FOLD-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR5374-5p	Glyma.08G180700	3,5	18,19	1595	1615	GUUUUAGAUGUCAGAUAAUGA	Cleavage	(1 of 4) K14298 - mRNA export factor (RAE1, GLE2)	

gma-miR5374-5p	Glyma.06G024400	4	22,35	704	724	UUUCUAGGUGUUAGACUUUUAU	Cleavage	(1 of 7) PTHR10585:SF34 - ER LUMEN PROTEIN RETAINING RECEPTOR-LIKE PROTEIN
----------------	-----------------	---	-------	-----	-----	------------------------	----------	--

Result of the target genes found with psRNATarget tool for the group of miRNAs that did NOT show count in any of all four libraries and were differentially expressed (group called G2) - 173 unique glymas

miRNA_Acc,	Target_Acc,	Expect	UPE\$	Target_start	Target_end	Target_aligned_fragment	Inhibition	
gma-miR156a/h/u/v/x/w/y	Glyma.19G146000	5	9,645	1491	1510	GCACUUGUUUUUUUUUGUCA	Cleavage	(1 of 46) PF03110 - SBP domain (SBP)
gma-miR156a/h/u/v/x/w/y	Glyma.19G146000	5	9,645	1491	1510	GCACUUGUUUUUUUUUGUCA	Cleavage	(1 of 46) PF03110 - SBP domain (SBP)
gma-miR156a/h/u/v/x/w/y	Glyma.19G146000	5	9,645	1491	1510	GCACUUGUUUUUUUUUGUCA	Cleavage	(1 of 46) PF03110 - SBP domain (SBP)
gma-miR156h/a/u/v/w/x/y	Glyma.19G146000	5	9,645	1491	1510	GCACUUGUUUUUUUUUGUCA	Cleavage	(1 of 46) PF03110 - SBP domain (SBP)
gma-miR159b-5p/f-5p	Glyma.10G153400	4	13,397	78	98	AACUUGGAGUGCAGGAAGUAC	Cleavage	0
gma-miR159b-5p/f-5p	Glyma.20G112800	4	15,187	3547	3567	CUCUUGGAGUGCUGGGAACGA	Cleavage	(1 of 1) KOG1999 - RNA polymerase II transcription elongation factor DSIF/SUPT5H/SPT5
gma-miR159b-5p/f-5p	Glyma.02G220200	3,5	17,363	552	572	UGCUUGGACUGAAGGGAGCUC	Translation	0
gma-miR159b-5p/f-5p	Glyma.17G053500	4,5	16,693	508	528	GGUUUGGAGUGGAGGGAGAUU	Translation	(1 of 8) K02218 - casein kinase 1 (CSNK1, CK1)
gma-miR159b-5p/f-5p	Glyma.15G171500	4,5	17,011	167	187	GGUUUGGAGUGGAGGGAGAUU	Translation	(1 of 9) PTHR11909:SF154 - PROTEIN KINASE FAMILY PROTEIN
gma-miR159b-5p/f-5p	Glyma.15G171100	4,5	17,011	1571	1591	GGUUUGGAGUGGAGGGAGAUU	Translation	(1 of 8) K02218 - casein kinase 1 (CSNK1, CK1)

gma-miR159b-5p/f-5p	Glyma.19G247600	4	17,673	1396	1416	GGUUUGGACUGCAUGGAACUU	Cleavage	(1 of 2) PTHR31314:SF12 - MYB FAMILY TRANSCRIPTION FACTOR-RELATED	
gma-miR159b-5p/f-5p	Glyma.02G104900	4,5	17,641	1330	1350	GGCUUGGAAUGCAGGGAGAUUA	Cleavage	(1 of 7) 2.4.1.128 - Scopoletin glucosyltransferase	
gma-miR159b-5p/f-5p	Glyma.08G247100	5	17,153	1148	1168	GAUUUGGAGUUUAUGGAACUG	Translation	(1 of 14) 2.3.1.115 - Isoflavone-7-O-beta-glucoside 6"-O-malonyltransferase / Flavone/flavonol 7-O-beta-D-glucoside malonyltransferase	
gma-miR159b-5p/f-5p	Glyma.11G179200	4	18,319	3366	3386	GAUUUGGAUUGUAGGUAACUC	Cleavage	(1 of 32) PF07714//PF08263 - Protein tyrosine kinase (Pkinase_Tyr) // Leucine rich repeat N-terminal domain (LRRNT_2)	
gma-miR159b-5p/f-5p	Glyma.03G014600	3	19,56	786	806	ACCUUGGAGUUCAGGGAAUUG	Translation	(1 of 5) K00028 - malate dehydrogenase (decarboxylating) (E1.1.1.39)	
gma-miR159b-5p/f-5p	Glyma.07G074700	3	19,573	827	847	ACCUUGGAGUUCAGGGAAUUG	Translation	(1 of 5) K00028 - malate dehydrogenase (decarboxylating) (E1.1.1.39)	
gma-miR159b-5p/f-5p	Glyma.11G200800	3,5	19,291	2042	2062	UGCUUGGACUGAAGGGAGCUC	Translation		0
gma-miR159b-5p/f-5p	Glyma.07G061200	3	19,839	222	242	GUAUUGGAGUGAAGGGAGCUC	Translation		0
gma-miR159b-5p/f-5p	Glyma.13G155300	4	18,875	947	967	CAUUUGGAGUGCUGGGAUCUU	Cleavage		0
gma-miR159b-5p/f-5p	Glyma.16G052300	4,5	19,054	1989	2009	GACUUGGAGUAUUGGGAAUUU	Translation	(1 of 11) K16675 - palmitoyltransferase ZDHHC9/14/18 (ZDHHC9_14_18)	
gma-miR159b-5p/f-5p	Glyma.11G072700	4	19,652	1022	1042	GAGUUUGAAUGCAGGGAAUUC	Cleavage	(1 of 2) PTHR34284:SF1 - FG-GAP REPEAT-CONTAINING PROTEIN	

gma-miR159b-5p/f-5p	Glyma.14G187600	3,5	20,909	517	537	UGCUUGGACUGAAGGGAGCUC	Translation	0
gma-miR159b-5p/f-5p	Glyma.16G029800	3	21,84	238	258	GUAUUGGAGUGAAGGGAGCUC	Translation	0
gma-miR159b-5p/f-5p	Glyma.U026500	3,5	22,52	603	623	ACAAUGGAGUGAAGGGAACUC	Translation	(1 of 2) PTHR33527:SF4 - F13F21.27 PROTEIN-RELATED
gma-miR159b-5p/f-5p	Glyma.18G062700	3	23,21	296	316	GGCUUGCAUUGCAGGGAAUUC	Cleavage	(1 of 3) PTHR12183:SF16 - PROTEIN ABERRANT POLLEN DEVELOPMENT 1-RELATED
gma-miR159b-5p/f-5p	Glyma.13G105900	4,5	21,968	529	549	GGUUUGGAGUGGAGGGAGAUU	Translation	(1 of 8) K02218 - casein kinase 1 (CSNK1, CK1)
gma-miR159b-5p/f-5p	Glyma.18G134000	5	22,23	861	881	GGCUUCGAGUGGAGGGAACGU	Translation	(1 of 9) PTHR24298:SF45 - CYTOCHROME P450 89A2-RELATED
gma-miR167a/b/d	Glyma.11G193900	4	11,102	914	934	UGGAUUAUGCUGGCAACAUA	Cleavage	(1 of 8) K16298 - serine carboxypeptidase-like clade IV [EC:3.4.16.-] (SCPL-IV)
gma-miR167a/b/d	Glyma.02G201800	3,5	12,329	2661	2681	UAGUUUAUGCUGUCAGUUUCA	Cleavage	(1 of 3) PF01535//PF12854//PF13041//PF13812//PF14432 - PPR repeat (PPR) // PPR repeat (PPR_1) // PPR repeat family (PPR_2) // Pentatricopeptide repeat domain (PPR_3) // DYW family of nucleic acid deaminases (DYW_deaminase)
gma-miR167a/b/d	Glyma.05G239800	3,5	13,428	437	457	AAGAUUAUGUUGGCAGCUUGG	Cleavage	(1 of 11) PTHR26402//PTHR26402:SF593 - RESPONSE REGULATOR OF TWO-COMPONENT SYSTEM // SUBFAMILY NOT NAMED

gma-miR167a/b/d	Glyma.08G219600	3	15,794	629	649	UGGAUAAUGCUAGUAGCUUCA	Translation	(1 of 7) PF15054 - Domain of unknown function (DUF4535) (DUF4535)
gma-miR167a/b/d	Glyma.14G032700	3,5	18,499	3006	3026	GAGAUCAGGCUGGCAGCUUGU	Cleavage	(1 of 36) PF02309//PF02362//PF06507 - AUX/IAA family (AUX_IAA) // B3 DNA binding domain (B3) // Auxin response factor (Auxin_resp)
gma-miR167a/b/d	Glyma.16G119900	3,5	19,105	299	319	GAGAUUGUGUUGGCAGCUAUA	Cleavage	(1 of 9) PTHR11079//PTHR11079:SF90 - CYTOSINE DEAMINASE // SUBFAMILY NOT NAMED
gma-miR167a/b/d	Glyma.02G281700	3,5	19,207	3039	3059	GAGAUCAGGCUGGCAGCUUGU	Cleavage	(1 of 36) PF02309//PF02362//PF06507 - AUX/IAA family (AUX_IAA) // B3 DNA binding domain (B3) // Auxin response factor (Auxin_resp)
gma-miR167a/b/d	Glyma.15G091000	3,5	19,394	3209	3229	GAGAUCAGGCUGGCAGCUUGU	Cleavage	(1 of 4) PTHR31384:SF3 - AUXIN RESPONSE FACTOR 6
gma-miR167a/b/d	Glyma.13G221400	3,5	19,838	3348	3368	GAGAUCAGGCUGGCAGCUUGU	Cleavage	(1 of 4) PTHR31384:SF3 - AUXIN RESPONSE FACTOR 6
gma-miR167a/b/d	Glyma.05G143800	3,5	20,448	3367	3387	GAGAUCAGGCUGGCAGCUUGU	Cleavage	(1 of 4) PTHR31384:SF3 - AUXIN RESPONSE FACTOR 6
gma-miR167a/b/d	Glyma.08G100100	3,5	21,648	3523	3543	GAGAUCAGGCUGGCAGCUUGU	Cleavage	(1 of 4) PTHR31384:SF3 - AUXIN RESPONSE FACTOR 6
gma-miR167a/b/d	Glyma.04G101200	3	22,771	3015	3035	CAGGUCGUGCUGGUGGCUUCU	Cleavage	(1 of 2) PTHR37701:SF1 - METHYL-CPG-BINDING DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 8
gma-miR167a/b/d	Glyma.18G046800	3,5	23,701	2868	2888	UAGAUCAGGCUGGCAGCUUGU	Cleavage	(1 of 6) PTHR31384:SF2 - AUXIN RESPONSE FACTOR 8
gma-miR167a/b/d	Glyma.11G204200	3,5	24,911	2927	2947	UAGAUCAGGCUGGCAGCUUGU	Cleavage	(1 of 6) PTHR31384:SF2 - AUXIN RESPONSE FACTOR 8

gma-miR167c/j	Glyma.05G239800	3,5	13,428	437	457	AAGAUUAUGUUGGCAGCUUGG	Cleavage	(1 of 11) PTHR26402//PTHR26402:SF593 - RESPONSE REGULATOR OF TWO-COMPONENT SYSTEM // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR167c/j	Glyma.08G219600	3	15,794	629	649	UGGAUAAUGCUAGUAGCUUCA	Translation	(1 of 7) PF15054 - Domain of unknown function (DUF4535) (DUF4535)	
gma-miR167c/j	Glyma.17G211300	3,5	18,31	2179	2199	CAGAGUUUGCUGGCAGCUUCU	Cleavage		0
gma-miR167c/j	Glyma.14G032700	3,5	18,499	3006	3026	GAGAUCAGGCUGGCAGCUUGU	Cleavage	(1 of 36) PF02309//PF02362//PF06507 - AUX/IAA family (AUX_IAA) // B3 DNA binding domain (B3) // Auxin response factor (Auxin_resp)	
gma-miR167c/j	Glyma.16G119900	3,5	19,105	299	319	GAGAUUGUGUUGGCAGCUAUA	Cleavage	(1 of 9) PTHR11079//PTHR11079:SF90 - CYTOSINE DEAMINASE // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR167c/j	Glyma.02G281700	3,5	19,207	3039	3059	GAGAUCAGGCUGGCAGCUUGU	Cleavage	(1 of 36) PF02309//PF02362//PF06507 - AUX/IAA family (AUX_IAA) // B3 DNA binding domain (B3) // Auxin response factor (Auxin_resp)	
gma-miR167c/j	Glyma.15G091000	3,5	19,394	3209	3229	GAGAUCAGGCUGGCAGCUUGU	Cleavage	(1 of 4) PTHR31384:SF3 - AUXIN RESPONSE FACTOR 6	
gma-miR167c/j	Glyma.01G227100	4	18,989	481	501	CAGAUUGUGGUGGAAGCUUCA	Cleavage	(1 of 4) PTHR24078//PTHR24078:SF187 - DNAJ HOMOLOG SUBFAMILY C MEMBER // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR167c/j	Glyma.13G221400	3,5	19,838	3348	3368	GAGAUCAGGCUGGCAGCUUGU	Cleavage	(1 of 4) PTHR31384:SF3 - AUXIN RESPONSE FACTOR 6	

gma-miR167c/j	Glyma.05G143800	3,5	20,448	3367	3387	GAGAUCAGGCUGGCAGCUUGU	Cleavage	(1 of 4) PTHR31384:SF3 - AUXIN RESPONSE FACTOR 6	
gma-miR167c/j	Glyma.08G100100	3,5	21,648	3523	3543	GAGAUCAGGCUGGCAGCUUGU	Cleavage	(1 of 4) PTHR31384:SF3 - AUXIN RESPONSE FACTOR 6	
gma-miR167c/j	Glyma.04G101200	3	22,771	3015	3035	CAGGUCGUGCUGGUGGCUUCU	Cleavage	(1 of 2) PTHR37701:SF1 - METHYL-CPG-BINDING DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 8	
gma-miR167c/j	Glyma.18G046800	3,5	23,701	2868	2888	UAGAUCAGGCUGGCAGCUUGU	Cleavage	(1 of 6) PTHR31384:SF2 - AUXIN RESPONSE FACTOR 8	
gma-miR167c/j	Glyma.11G204200	3,5	24,911	2927	2947	UAGAUCAGGCUGGCAGCUUGU	Cleavage	(1 of 6) PTHR31384:SF2 - AUXIN RESPONSE FACTOR 8	
gma-miR169k/l-5p	Glyma.17G051400	3,5	11,822	1348	1368	CUGGCAAUAUCAUCCUUGGCUU	Cleavage	(1 of 4) PTHR12632//PTHR12632:SF8 - TRANSCRIPTION FACTOR NF-Y ALPHA-RELATED // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR169k/l-5p	Glyma.13G319200	3,5	14,332	880	900	CUUGUAAGUUGUUUUUGGUUG	Cleavage	(1 of 4) PTHR33285:SF2 - PHYTOSULFOKINES 6-RELATED	
gma-miR169k/l-5p	Glyma.13G107900	3,5	14,726	1053	1073	CUGGCAAUAUCAUCCUUGGCUU	Cleavage	(1 of 4) PTHR12632//PTHR12632:SF8 - TRANSCRIPTION FACTOR NF-Y ALPHA-RELATED // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR169k/l-5p	Glyma.02G109500	3	17,146	1104	1124	UCGGCAAGUCAUCUUUGGCUA	Cleavage		0
gma-miR169k/l-5p	Glyma.10G019000	3	17,973	3821	3841	AUGGCAAGUGAUUAUUGGCUG	Cleavage	(1 of 7) PTHR24223:SF246 - ABC TRANSPORTER C FAMILY MEMBER 14-RELATED	
gma-miR169k/l-5p	Glyma.04G253600	3	18,929	1044	1064	UAGGCAAGUUAUUCUUGACUA	Cleavage		0
gma-miR169k/l-5p	Glyma.19G210700	3	19,09	2986	3006	AUGGCAAGUGAUUAUUGGCUG	Cleavage	(1 of 7) PTHR24223:SF246 - ABC TRANSPORTER C FAMILY MEMBER 14-RELATED	

gma-miR169k/l-5p	Glyma.14G097500	4	18,316	509	529	CUGGCAAGUGGUUUUAUGGCUG	Cleavage	(1 of 4) PTHR33193:SF8 - GENOMIC DNA, CHROMOSOME 3, P1 CLONE: MDC16
gma-miR171b-5p	Glyma.12G199800	5	10,913	371	393	AAGUUGUACCAUUAUUACGUUUU	Cleavage	(1 of 152) PF02458 - Transferase family (Transferase)
gma-miR171b-5p	Glyma.13G305000	5	15,53	4207	4229	UUCCUGCACCGAUACCAUGUUGU	Cleavage	(1 of 4) PTHR22884:SF343 - PROTEIN MET-1, ISOFORM A
gma-miR171b-5p	Glyma.06G309900	5	16,185	2187	2209	CAGCUGUGCCAGUUUCAUCCCGU	Translation	(1 of 4) PTHR10857:SF46 - DCD (DEVELOPMENT AND CELL DEATH) DOMAIN PROTEIN
gma-miR171b-5p	Glyma.04G122400	5	16,337	1761	1783	CAGCUGUGCCAGUUUCAUCCCGU	Translation	(1 of 4) PTHR10857:SF46 - DCD (DEVELOPMENT AND CELL DEATH) DOMAIN PROTEIN
gma-miR171b-5p	Glyma.10G253200	5	16,913	1071	1092	UAGUCGUGCCAGUGUU-CGCCGU	Cleavage	(1 of 31) PTHR27002:SF122 - CYSTEINE-RICH RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 28-RELATED
gma-miR171b-5p	Glyma.04G025400	5	18,268	980	1002	AAGCAGUACCAGUACCAUGCUGC	Cleavage	(1 of 3) KOG4687 - Uncharacterized coiled-coil protein
gma-miR171b-5p	Glyma.12G071300	5	18,413	3444	3466	CUGUUGUGUCAGUAUCAUGCCUC	Cleavage	(1 of 4) PTHR10782:SF34 - E3 SUMO-PROTEIN LIGASE SIZ1
gma-miR171b-5p	Glyma.14G079400	5	18,48	1301	1323	GAGUAGUGCAAAUAUCAUGUGGU	Cleavage	(1 of 2) PTHR11119:SF29 - NUCLEOBASE-ASCORBATE TRANSPORTER 3
gma-miR171b-5p	Glyma.01G228000	5	18,9	2165	2187	AAGUUGUGCUAAGCUC AUGCCGU	Translation	(1 of 57) PF01535//PF13041//PF13812 - PPR repeat (PPR) // PPR repeat family (PPR_2) // Pentatricopeptide repeat domain (PPR_3)

gma-miR171b-5p	Glyma.03G042100	5	19,543	278	300	GGGUCGUAUUGAUUUCAGGUUGC	Cleavage	(1 of 9) PTHR11875:SF60 - NAP1-RELATED PROTEIN 1-RELATED
gma-miR171b-5p	Glyma.17G245700	5	19,686	1277	1299	GAGUAGUGCAAAUAUCAUGUGGU	Cleavage	(1 of 2) PTHR11119:SF29 - NUCLEOBASE-ASCORBATE TRANSPORTER 3
gma-miR171b-5p	Glyma.02G087700	5	24,287	44	66	GUGCUGUACUAGUGUUACGCCCG	Cleavage	(1 of 7) K04564 - superoxide dismutase, Fe-Mn family (SOD2)
gma-miR171b-5p	Glyma.02G154600	5	24,32	1273	1295	GGGCUGUACCGAUACCGCGUUGG	Cleavage	(1 of 2) PTHR31901:SF18 - INDOLE-3-ACETIC ACID-AMIDO SYNTHETASE GH3.9-RELATED
gma-miR171k-3p	Glyma.12G080100	3	13,067	1109	1129	UAUGAUGUUGGUGUGCCUCAA	Cleavage	(1 of 54) K08235 - xyloglucan:xyloglucosyl transferase (E2.4.1.207)
gma-miR171k-3p	Glyma.14G189000	3,5	12,975	903	923	CAUGAUGUUGGUGUGUUUUAU	Cleavage	(1 of 3) PTHR34376:SF2 - SERINE PROTEASE INHIBITOR, KAZAL-TYPE FAMILY PROTEIN
gma-miR171k-3p	Glyma.10G260000	4	13,643	271	291	AGCAAUAUUAGCGUGGCUCAA	Cleavage	(1 of 2) PTHR12537:SF63 - PUMILIO HOMOLOG 14-RELATED
gma-miR171k-3p	Glyma.15G270800	3	15,267	439	459	GGUGAUUUGACGAGGCUCAA	Translation	(1 of 701) PF01535 - PPR repeat (PPR)
gma-miR171k-3p	Glyma.05G028300	3	18,312	801	821	AUUGCUAUUGGUGCUGCUCAA	Cleavage	(1 of 5) PTHR27001:SF160 - PROTEIN KINASE 2A, CHLOROPLASTIC-RELATED
gma-miR171k-3p	Glyma.18G232900	5	18,257	3872	3892	UGUGAUGUUGGCGAGGCUUUU	Cleavage	(1 of 4) PTHR13992:SF25 - MEDIATOR OF RNA POLYMERASE II TRANSCRIPTION SUBUNIT 12
gma-miR171k-3p	Glyma.08G139800	4	19,363	169	189	GGUGAUAGUGUCGAGGCUCAA	Translation	0
gma-miR171k-3p	Glyma.09G259400	5	18,46	3822	3842	UGUGAUGUUGGCGAGGCUUUU	Cleavage	(1 of 4) PTHR13992:SF25 - MEDIATOR OF RNA POLYMERASE II TRANSCRIPTION SUBUNIT 12

gma-miR171k-3p	Glyma.13G003800	4,5	19,597	2912	2932	AGUGAUGUUGGUGUGGUUCCCC	Cleavage	(1 of 1) PTHR10024:SF182 - C2 CALCIUM/LIPID-BINDING AND PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE C-TERMINAL DOMAIN-CONTAINING PROTEIN
gma-miR171k-3p	Glyma.14G029600	3	21,319	844	864	CCUUAUAUUGGUGAGGCUCAA	Cleavage	(1 of 6) PTHR31479:SF3 - GB
gma-miR171k-3p	Glyma.11G110100	5	22,187	110	130	AGUGAUAAUGGCUCCGUUCAG	Cleavage	(1 of 11) K02155 - V-type H ⁺ -transporting ATPase 16kDa proteolipid subunit (ATPeV0C, ATP6L)
gma-miR171k-3p	Glyma.03G074900	3,5	23,947	720	740	AUUGAUUUGCAGCGGUUCAA	Translation	(1 of 2) PTHR31741:SF4 - O-FUCOSYLTRANSFERASE FAMILY PROTEIN
gma-miR171k-3p	Glyma.18G220200	5	24,31	353	373	GGUGGUAUGGGCGCGGUUCCG	Cleavage	(1 of 3) PTHR32116:SF12 - GALACTURONOSYLTRANSFERASE 7-RELATED
gma-miR171n/p	Glyma.13G295000	4	11,458	1423	1443	UAAGAUUUUAUGUGGCUAAA	Cleavage	(1 of 3) 2.6.1.80 - Nicotianamine aminotransferase / Nicotianamine transaminase
gma-miR171n/p	Glyma.11G216800	3	13,602	1320	1340	AAGGAUGUUGAUGCGGCACAA	Cleavage	(1 of 4) 2.7.11.31 - [Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (NADPH)] kinase / Reductase kinase
gma-miR171n/p	Glyma.07G039800	3	16,209	2032	2052	GUUGAUUUGACGCGGUUAAA	Cleavage	(1 of 19) 1.14.13.21 - Flavonoid 3'-monooxygenase / Flavonoid 3'-hydroxylase
gma-miR171n/p	Glyma.10G261600	3	17,042	2658	2678	UGUGGUAUUGGCGUGGUUCAA	Cleavage	(1 of 3) PTHR27008:SF42 - LEUCINE-RICH REPEAT PROTEIN KINASE-LIKE PROTEIN
gma-miR171n/p	Glyma.18G058000	3	17,802	67	87	UGAGAUUGUGACGCGCUUAG	Cleavage	(1 of 5) PTHR31301:SF4 - LOB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 12

gma-miR171n/p	Glyma.08G044400	4	16,861	1299	1319	GAAGAAAUUGAUGCGGCUCUG	Cleavage	(1 of 4) PTHR31713:SF15 - PROTEIN SAR DEFICIENT 1	
gma-miR171n/p	Glyma.11G010000	4	17,556	519	539	UAGGGUUUUGUUGCGGCUCAA	Translation	(1 of 2) K09591 - steroid 5-alpha-reductase (DET2)	
gma-miR171n/p	Glyma.07G144400	4	17,914	519	539	UAGGGUUUUGUUGCGGCUCAA	Translation	(1 of 2) K09591 - steroid 5-alpha-reductase (DET2)	
gma-miR171n/p	Glyma.13G098600	3,5	18,831	2894	2914	GAAGAUAUUGACGUGACUAAA	Cleavage	(1 of 4) K05768 - gelsolin (GSN)	
gma-miR171n/p	Glyma.12G053300	3,5	18,973	1019	1039	UGAGACAUUGGUGGGGCUCAA	Cleavage		0
gma-miR171n/p	Glyma.06G196800	4	18,639	1547	1567	AAAGAUAUUGGCGUGGAUUAU	Cleavage	(1 of 4) PTHR23213:SF210 - FORMIN-LIKE PROTEIN 15A-RELATED	
gma-miR171n/p	Glyma.20G129200	3	19,877	2661	2681	UGUGGUAUUGGCGUGGUUCA	Cleavage	(1 of 3) PTHR27008:SF42 - LEUCINE-RICH REPEAT PROTEIN KINASE-LIKE PROTEIN	
gma-miR171n/p	Glyma.17G061200	3,5	19,899	3862	3882	GAAGAUAUUGACGUGACUAAA	Cleavage	(1 of 4) K05768 - gelsolin (GSN)	
gma-miR171n/p	Glyma.13G343400	3,5	20,471	1272	1292	UGAGACAUUGGUGGGGCUCAA	Cleavage		0
gma-miR171n/p	Glyma.05G047700	3,5	20,681	513	533	UAAGAUAUUGGCGGACACAA	Cleavage	(1 of 4) PTHR13780:SF36 - SNF1-RELATED PROTEIN KINASE REGULATORY SUBUNIT GAMMA-1	
gma-miR171n/p	Glyma.20G026300	3	21,742	1090	1110	GAAGACAUUGAUGCAGCUCAA	Cleavage	(1 of 3) PTHR10353:SF26 - BETA-GLUCOSIDASE 40	
gma-miR171n/p	Glyma.01G177200	3	24,72	699	719	ACUGAUAUUGGAGCGGCUCAA	Translation	(1 of 4) PTHR31636:SF53 - SCARECROW-LIKE PROTEIN 15	
gma-miR171n/p	Glyma.11G065200	3	24,901	534	554	GGUGAUAUUGGAGCGGCUCAA	Translation	(1 of 4) PTHR31636:SF53 - SCARECROW-LIKE PROTEIN 15	

gma-miR319p	Glyma.14G173300	3,75	9,512	1553	1575	CAAGCUCCCUUCAGAUUCCAAAA	Cleavage	(1 of 62) PF00560//PF13855 - Leucine Rich Repeat (LRR_1) // Leucine rich repeat (LRR_8)
gma-miR319p	Glyma.01G185800	3	15,553	96	116	CGAUUUUCCUUUGGUCCAAAA	Cleavage	(1 of 4) PTHR10015:SF166 - HEAT STRESS TRANSCRIPTION FACTOR B-1
gma-miR319p	Glyma.20G149200	3,5	15,235	1122	1142	UGGGUUUUCUCAAUCCAAAA	Cleavage	(1 of 1) KOG4643//KOG4674 - Uncharacterized coiled-coil protein // Uncharacterized conserved coiled-coil protein
gma-miR319p	Glyma.19G219500	3	15,927	2571	2591	AGAGGUCCCCUCAGUCCAAAG	Cleavage	(1 of 4) PTHR11453:SF44 - BORON TRANSPORTER 1-RELATED
gma-miR319p	Glyma.10G206500	4,5	16,259	870	890	GGGGUUUUCUCAUUUUAAAA	Cleavage	(1 of 5) PTHR10641//PTHR10641:SF508 - MYB-LIKE DNA-BINDING PROTEIN MYB // SUBFAMILY NOT NAMED
gma-miR319p	Glyma.12G168800	4	16,859	1944	1964	GGAGUUUCUCCAGUUCAGAA	Translation	(1 of 2) K09522 - DnaJ homolog subfamily C member 2 (DNAJC2)
gma-miR319p	Glyma.07G110700	4	17,472	107	127	GGAGCUCCAUUCGAUCCAAAG	Cleavage	(1 of 4) PTHR10641:SF488 - DUO POLLEN 1
gma-miR319p	Glyma.20G154300	3	18,693	162	182	CGAUCUCUUUUCGGUCCAGAA	Cleavage	(1 of 2) PTHR10869:SF80 - IRON ION BINDING / OXIDOREDUCTASE
gma-miR319p	Glyma.20G047600	3	18,842	1514	1534	GGAGCUCCCUUCACUCCAAUA	Cleavage	(1 of 3) PTHR10641:SF540 - MYB TRANSCRIPTION FACTOR
gma-miR319p	Glyma.03G115400	4	18,047	107	127	GGAGCUCCAUUCGAUCCAAAG	Cleavage	(1 of 4) PTHR10641:SF488 - DUO POLLEN 1
gma-miR319p	Glyma.08G188900	4	18,102	2036	2056	GGAGUUUCUCCAGUUCAGAA	Translation	(1 of 2) K09522 - DnaJ homolog subfamily C member 2 (DNAJC2)
gma-miR319p	Glyma.13G073400	3	19,69	1090	1110	GGAGCUCCCUUCACUCCAAUA	Cleavage	(1 of 3) PTHR10641:SF540 - MYB TRANSCRIPTION FACTOR
gma-miR319p	Glyma.11G235400	4	20,061	1239	1259	GGUGUUCUUUUUGGUUCCAAAA	Cleavage	(1 of 4) 4.1.1.37 - Uroporphyrinogen decarboxylase / Uroporphyrinogen-III carboxylase

gma-miR319p	Glyma.13G187500	3	21,093	1820	1840	GGAGCUCCCUUCACUCCAUA	Cleavage	(1 of 6) PTHR10641:SF475 - MYB TRANSCRIPTION FACTOR-RELATED	
gma-miR319p	Glyma.18G021500	4	20,556	1129	1149	GGCGUUCUUUUUGGUCAAAA	Cleavage	(1 of 4) 4.1.1.37 - Uroporphyrinogen decarboxylase / Uroporphyrinogen-III carboxylase	
gma-miR319p	Glyma.10G265300	4,5	20,234	442	462	GGGGCUCACUUCAGUCCAGUC	Cleavage		0
gma-miR319p	Glyma.03G222300	3	22,607	2544	2564	AGAGGUCCCCUCAGUCCAAG	Cleavage	(1 of 4) PTHR11453:SF44 - BORON TRANSPORTER 1-RELATED	
gma-miR319p	Glyma.15G225300	3	23,532	1342	1362	GGAGCUCCCUUCACUCCAUA	Cleavage	(1 of 6) PTHR10641:SF475 - MYB TRANSCRIPTION FACTOR-RELATED	
gma-miR319p	Glyma.04G100900	4	23,348	1592	1612	GGAGCUCUCUCAAUUUAAGG	Cleavage	(1 of 30) PF11955 - Plant organelle RNA recognition domain (PORR)	
gma-miR319p	Glyma.11G200800	4,5	23,447	1894	1914	AGAGCUCCUUCAGUCCACUC	Cleavage		0
gma-miR319q	Glyma.02G024400	3	15,67	1551	1571	GAGGGGGCUUCUUUUAGUCUA	Cleavage	(1 of 1) PTHR27005:SF56 - PROTEIN KINASE SUPERFAMILY PROTEIN	
gma-miR319q	Glyma.02G220200	4	17,696	404	424	GAAGGAGUUUCCUCAGCCCA	Cleavage		0
gma-miR319q	Glyma.14G187600	3,5	18,428	356	376	GAAGGAGCUUCCUCAGCCCA	Cleavage		0
gma-miR319q	Glyma.13G212000	3	19,26	145	165	AAAGGGGCUUUUUUCAGUCUG	Cleavage	(1 of 5) 1.8.4.12 - Peptide-methionine (R)-S-oxide reductase / Selenoprotein R	
gma-miR319q	Glyma.06G157500	3,5	19,534	148	167	GAAGGAGCUCCUUUCA-UCCA	Cleavage	(1 of 4) PTHR13683:SF227 - ASPARTYL PROTEASE FAMILY PROTEIN	
gma-miR319q	Glyma.04G208200	3,5	20,019	256	275	GAAGGAGCUCCUUUC-GUCCA	Cleavage	(1 of 4) PTHR13683:SF227 - ASPARTYL PROTEASE FAMILY PROTEIN	
gma-miR319q	Glyma.09G195800	3	23,584	245	265	CUCGGAGCUCCUUCGGUUCU	Cleavage	(1 of 5) K04460 - serine/threonine-protein phosphatase 5 (PPP5C)	

gma-miR398a/b	Glyma.02G190000	3,5	12,922	2991	3011	AAUAGGUGGUCUGAGAGCACA	Cleavage	(1 of 4) K14674 - TAG lipase / steryl ester hydrolase / phospholipase A2 / LPA acyltransferase (TGL4)
gma-miR398a/b	Glyma.06G185000	3	15,472	802	821	AAGGGGUGAC-UGAGAACACA	Translation	(1 of 16) K09377 - cysteine and glycine-rich protein (CSRP)
gma-miR398a/b	Glyma.03G049100	4	15,384	2642	2662	AAAGGGUGAUCAGAGAACAUG	Translation	(1 of 30) KOG0617 - Ras suppressor protein (contains leucine-rich repeats)
gma-miR398a/b	Glyma.10G106500	4,5	15,335	551	571	AGGGUGUGGUCUGAGAACAGU	Cleavage	(1 of 3) K11665 - DNA helicase INO80 [EC:3.6.4.12] (INO80, INOC1)
gma-miR398a/b	Glyma.16G152300	4	16,553	975	995	AAGAGGUGACCUGGGAAUGGA	Cleavage	(1 of 3) PTHR11817//PTHR11817:SF34 - PYRUVATE KINASE // SUBFAMILY NOT NAMED
gma-miR398a/b	Glyma.20G108600	4	17,218	960	980	GAGGGGUGACUUGGGCAGACA	Cleavage	(1 of 6) PTHR31314:SF10 - HOMEODOMAIN-LIKE SUPERFAMILY PROTEIN-RELATED
gma-miR398a/b	Glyma.10G281000	4	17,811	860	880	GAGGGGUGACUUGGGCAGACA	Cleavage	(1 of 6) PTHR31314:SF10 - HOMEODOMAIN-LIKE SUPERFAMILY PROTEIN-RELATED
gma-miR398a/b	Glyma.05G197400	3,5	18,603	1521	1541	UGUUGGUGCCCUGAGAACACA	Cleavage	(1 of 2) 1.2.1.76 - Succinate-semialdehyde dehydrogenase (acetylating) / Succinyl-CoA reductase
gma-miR398a/b	Glyma.10G095100	3,5	18,737	1081	1101	GAGAGGUGAUUGGAGAACACA	Translation	(1 of 14) PTHR10593//PTHR10593:SF41 - SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE RIO // SUBFAMILY NOT NAMED
gma-miR398a/b	Glyma.05G227100	3,5	19,519	486	506	AGGGAGUGAGCUGGGGACACA	Cleavage	(1 of 2) PTHR13832//PTHR13832:SF357 - PROTEIN PHOSPHATASE 2C // SUBFAMILY NOT NAMED

gma-miR398a/b	Glyma.09G037100	4	19,041	682	702	UAGGGGUGAUGUGAGAUCAUA	Translation	(1 of 124) 3.2.1.39 - Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase / Laminarinase	
gma-miR398a/b	Glyma.03G047800	5	18,136	311	331	AAGGGGGGAACUGAGAACAGU	Cleavage	(1 of 3) K12874 - intron-binding protein aquarius (AQR)	
gma-miR398a/b	Glyma.02G071000	4	20,228	567	587	AAGAGGUGACCUGGGAAUGGA	Cleavage	(1 of 3) PTHR11817//PTHR11817:SF34 - PYRUVATE KINASE // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR398a/b	Glyma.15G142400	4	22,202	622	642	CAGGGGUGAUGUGAGAUCAUA	Translation	(1 of 124) 3.2.1.39 - Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase / Laminarinase	
gma-miR398a/b	Glyma.12G225600	4,5	21,752	695	715	AAGGGGUGGCCAGAGGAUGUG	Translation	(1 of 4) PTHR11206:SF78 - MATE EFFLUX FAMILY PROTEIN ALF5-RELATED	
gma-miR398a/b	Glyma.12G057000	4	22,41	1164	1184	GAGGGGUGAUUGGAGAACUCA	Translation	(1 of 17) PTHR10593//PTHR10593:SF27 - SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE RIO // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR398a/b	Glyma.18G106300	3	23,45	1060	1080	UUGGGGUGGUCUGAGGGCACU	Cleavage	(1 of 7) K12450 - UDP-glucose 4,6-dehydratase (RHM)	
gma-miR398a/b	Glyma.19G172100	4	23,296	827	847	AAGGGGAGGCCGGAGAAUGCA	Translation		0
gma-miR4416a	Glyma.18G283900	3,5	13,71	1275	1294	ACUAUGUGAGAGUGAUCUGA	Cleavage	(1 of 1) K15363 - fanconi-associated nuclease 1 (FAN1, MTMR15)	
gma-miR4416a	Glyma.07G011200	4	13,39	408	427	UCUGGAUGAGAGCGUUCUGU	Cleavage	(1 of 2) PTHR21206 - SLD5 PROTEIN	
gma-miR4416a	Glyma.01G166300	4,5	14,149	1037	1056	CUUUGGUGAGAGUGAUUCUU	Cleavage	(1 of 2) PTHR28039:SF1 - CHALCONE-FLAVANONE ISOMERASE FAMILY PROTEIN	
gma-miR4416a	Glyma.14G223900	3,5	15,384	1210	1229	ACAAGGUGGGAGUGACCCAU	Cleavage	(1 of 2) PTHR10366//PTHR10366:SF355 - NAD DEPENDENT EPIMERASE/DEHYDRATASE // SUBFAMILY NOT NAMED	

gma-miR4416a	Glyma.10G107700	5	13,896	1156	1176	AACAGGUGAGAGCGAGCCCGU	Cleavage	(1 of 4) PTHR24093:SF296 - CALCIUM-TRANSPORTING ATPASE 4, PLASMA MEMBRANE-TYPE-RELATED	
gma-miR4416a	Glyma.13G253800	4,5	14,686	6	25	AAAAGGUGAGGGUGACCAGU	Cleavage	(1 of 5) 1.8.4.12 - Peptide-methionine (R)-S-oxide reductase / Selenoprotein R	
gma-miR4416a	Glyma.14G088700	4	16,585	910	929	GGAAGGUGGGAGAGACCCGU	Cleavage	(1 of 1) PF00646//PF07646 - F-box domain (F-box) // Kelch motif (Kelch_2)	
gma-miR4416a	Glyma.13G171600	5	15,854	804	823	AGUAGGUGAGAGUGAUUCAG	Cleavage		0
gma-miR4416a	Glyma.13G262200	4,5	16,524	946	965	ACUAGAUGAGAGUGACCUUC	Cleavage	(1 of 2) 2.5.1.30 - Heptaprenyl diphosphate synthase / Trans-hexaprenyltranstransferase	
gma-miR4416a	Glyma.15G243100	4,5	16,998	835	854	ACUAGAUGAGAGUGACCUUC	Cleavage	(1 of 2) 2.5.1.30 - Heptaprenyl diphosphate synthase / Trans-hexaprenyltranstransferase	
gma-miR4416a	Glyma.15G061100	3	18,602	9	28	AAAAGGUGAGGGUGACCCGU	Cleavage	(1 of 5) 1.8.4.12 - Peptide-methionine (R)-S-oxide reductase / Selenoprotein R	
gma-miR4416a	Glyma.19G136400	4,5	18,197	1125	1144	GUCAGGUGAGAGCGAACCGG	Cleavage	(1 of 4) PTHR24093:SF296 - CALCIUM-TRANSPORTING ATPASE 4, PLASMA MEMBRANE-TYPE-RELATED	
gma-miR4416a	Glyma.16G210900	4,5	18,424	1162	1181	UUUAGGUGAGACUGAUCUGG	Cleavage	(1 of 2) PTHR13379 - UNCHARACTERIZED DUF1308	
gma-miR4416a	Glyma.18G220800	4	21,099	761	780	CCAUGGUGAGAGCAAUCCGU	Cleavage	(1 of 6) PTHR12290:SF18 - PROTEIN CORNICHON HOMOLOG 3-RELATED	
gma-miR4416a	Glyma.08G324000	4,5	21,549	1467	1486	CUUAGGUUAGAAUGACCGU	Cleavage	(1 of 1) PTHR13844//PTHR13844:SF14 - BRG-1 ASSOCIATED FACTOR 60 BAF60 // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR4416a	Glyma.17G001800	4,5	21,655	191	210	AGUGGGUGAGAGUGAUUCAU	Cleavage	(1 of 3) PTHR11654:SF177 - PROTEIN NRT1/ PTR FAMILY 4.3	

gma-miR4416a	Glyma.13G299900	4,5	22,954	977	996	AGAAGGUGAGAGCGGCUGGU	Cleavage	(1 of 3) K03644 - lipoic acid synthetase (lipA)	
gma-miR4416a	Glyma.02G219800	5	23,287	2010	2029	CCUAGGUGGGUGAGGUCUGU	Translation	(1 of 88) PF00069//PF00560//PF08263//PF13855 - Protein kinase domain (Pkinase) // Leucine Rich Repeat (LRR_1) // Leucine rich repeat N-terminal domain (LRRNT_2) // Leucine rich repeat (LRR_8)	
gma-miR5037c	Glyma.19G121700	4	5,517	7	26	CUGUGCCUCAAGUUCCACC	Cleavage	(1 of 3) K10583 - ubiquitin-conjugating enzyme E2 S (UBE2S, E2EPF)	
gma-miR5037c	Glyma.10G220600	4	6,982	296	315	GUCCACCUCAAGUUCCACU	Cleavage		0
gma-miR5037c	Glyma.14G168500	4,5	6,985	209	228	GCAAGCUUCAAGUUUCAA	Cleavage	(1 of 2) PTHR13683//PTHR13683:SF339 - ASPARTYL PROTEASES // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR5037c	Glyma.19G164400	3	10,226	560	579	CUAGGUUUUAAAGUUUACU	Cleavage	(1 of 2) PTHR11913//PTHR11913:SF21 - COFILIN-RELATED // SUBFAMILY NOT NAMED	
gma-miR5037c	Glyma.03G004200	4	10,936	6	25	CUGUGCCUCAAGUUCCACC	Cleavage	(1 of 3) K10583 - ubiquitin-conjugating enzyme E2 S (UBE2S, E2EPF)	
gma-miR5037c	Glyma.20G171000	4	13,384	262	281	GUCCACCUCAAGUUCCACU	Cleavage		0
gma-miR5037c	Glyma.15G002100	4	13,781	2002	2021	GCAGGUUUCAAGUUAUACA	Cleavage	(1 of 8) K17604 - zinc finger SWIM domain-containing protein 3 (ZSWIM3)	
gma-miR5037c	Glyma.08G026700	3	14,951	2617	2636	ACAGGCCUUGGAGUUUUAUU	Cleavage	(1 of 10) PF14604 - Variant SH3 domain (SH3_9)	

gma-miR5037c	Glyma.15G166200	3,5	15,026	1787	1806	AACGGCUUCAGAGUUUCACU	Cleavage	(1 of 4) PTHR12628:SF10 - POLYCOMB PROTEIN PCL
gma-miR5037c	Glyma.05G220300	3	15,748	2661	2680	ACAGGCCUUGGAGUUUUAUU	Cleavage	(1 of 10) PF14604 - Variant SH3 domain (SH3_9)
gma-miR5037c	Glyma.13G068200	3,5	15,299	2075	2094	GCAGGCUUCAAGAUUCCACC	Cleavage	(1 of 2) PTHR11654:SF82 - PROTEIN NRT1/ PTR FAMILY 5.8-RELATED
gma-miR5037c	Glyma.18G187000	5	15,243	244	266	UCAGGUCUCAAGCUUUUCCACU	Cleavage	(1 of 16) K08081 - Tropinone reductase 1 (TR1)
gma-miR5037c	Glyma.19G022000	4	17,675	2214	2233	GCAGGUUUCAAGUUACAAU	Cleavage	(1 of 3) PTHR10759//PTHR10759:SF1 - 60S RIBOSOMAL PROTEIN L34 // SUBFAMILY NOT NAMED
gma-miR5037c	Glyma.16G136500	4,5	17,388	316	335	GCAGGUUUCAGUGUUUCACC	Cleavage	(1 of 27) 3.2.1.58 - Glucan 1,3-beta-glucosidase / Exo-1,3-beta-glucosidase
gma-miR5037c	Glyma.14G014800	3,5	19,83	49	68	UGAGGUCUCUAAGUUUCACU	Translation	(1 of 2) K02739 - 20S proteasome subunit beta 2 (PSMB7)
gma-miR5037c	Glyma.03G040300	3,5	20,085	219	238	GCAAGCCUCAAGGUUGCAUU	Cleavage	(1 of 30) PF00234 - Protease inhibitor/seed storage/LTP family (Tryp_alpha_amyl)
gma-miR5037c	Glyma.06G261100	4	20,159	1243	1262	GAAGGCCUCAAGGUUCCAGA	Cleavage	(1 of 62) PF00954//PF01453//PF07714//PF08276 - S-locus glycoprotein domain (S_locus_glycop) // D-mannose binding lectin (B_lectin) // Protein tyrosine kinase (Pkinase_Tyr) // PAN-like domain (PAN_2)
gma-miR5037c	Glyma.08G306000	3,5	20,954	768	787	GCGUGCCUCAAGGUUCCAUA	Cleavage	(1 of 38) K15032 - mTERF domain-containing protein, mitochondrial (MTERFD)

gma-miR5037c	Glyma.08G275900	3	22,676	759	778	GUGUGCCUCAAGGUUCCAUAU	Cleavage	(1 of 38) K15032 - mTERF domain-containing protein, mitochondrial (MTERFD)
gma-miR5037c	Glyma.16G145300	3,5	23,494	1491	1510	GCAGGGCACGAGGUUCCACU	Cleavage	(1 of 3) PTHR11802:SF71 - SERINE CARBOXYPEPTIDASE-LIKE 26-RELATED
gma-miR5037c	Glyma.10G030000	3,5	23,942	10076	#####	GGAGGUCCAAAGUUUCACU	Cleavage	(1 of 1) PF00400//PF02138//PF13385//PF14844 - WD domain, G-beta repeat (WD40) // Beige/BEACH domain (Beach) // Concanavalin A-like lectin/glucanases superfamily (Laminin_G_3) // PH domain associated with Beige/BEACH (PH_BEACH)
gma-miR171b-5p	Glyma.02G154600	5	24,32	1273	1295	GGGCUGUACCGAUACCGCGUUGG	Cleavage	(1 of 2) PTHR31901:SF18 - INDOLE-3-ACETIC ACID-AMIDO SYNTHETASE GH3.9-RELATED
gma-miR171b-5p	Glyma.02G087700	5	24,287	44	66	GUGCUGUACUAGUGUUACGCCCG	Cleavage	(1 of 7) K04564 - superoxide dismutase, Fe-Mn family (SOD2)
gma-miR171b-5p	Glyma.03G042100	5	19,543	278	300	GGGUCGUAUUGAUUACAGGUUGC	Cleavage	(1 of 9) PTHR11875:SF60 - NAP1-RELATED PROTEIN 1-RELATED
gma-miR171b-5p	Glyma.04G122400	5	16,337	1761	1783	CAGCUGUGCCAGUUUCAUCCCGU	Translation	(1 of 4) PTHR10857:SF46 - DCD (DEVELOPMENT AND CELL DEATH) DOMAIN PROTEIN
gma-miR171b-5p	Glyma.06G309900	5	16,185	2187	2209	CAGCUGUGCCAGUUUCAUCCCGU	Translation	(1 of 4) PTHR10857:SF46 - DCD (DEVELOPMENT AND CELL DEATH) DOMAIN PROTEIN
gma-miR171b-5p	Glyma.04G025400	5	18,268	980	1002	AAGCAGUACCAGUACCAUGCUGC	Cleavage	(1 of 3) KOG4687 - Uncharacterized coiled-coil protein

gma-miR171b-5p	Glyma.13G305000	5	15,53	4207	4229	UUCCUGCACCGAUACCAUGUUGU	Cleavage	(1 of 4) PTHR22884:SF343 - PROTEIN MET-1, ISOFORM A
gma-miR171b-5p	Glyma.12G199800	5	10,913	371	393	AAGUUGUACCAUUAUUACGUUUU	Cleavage	(1 of 152) PF02458 - Transferase family (Transferase)
gma-miR171b-5p	Glyma.12G071300	5	18,413	3444	3466	CUGUUGUGUCAGUAUCAUGCCUC	Cleavage	(1 of 4) PTHR10782:SF34 - E3 SUMO-PROTEIN LIGASE SIZ1
gma-miR171b-5p	Glyma.01G228000	5	18,9	2165	2187	AAGUUGUGCUAAGCUCAUGCCGU	Translation	(1 of 57) PF01535//PF13041//PF13812 - PPR repeat (PPR) // PPR repeat family (PPR_2) // Pentatricopeptide repeat domain (PPR_3)
gma-miR171b-5p	Glyma.17G245700	5	19,686	1277	1299	GAGUAGUGCAAUAUCAUGUGGU	Cleavage	(1 of 2) PTHR11119:SF29 - NUCLEOBASE-ASCORBATE TRANSPORTER 3
gma-miR171b-5p	Glyma.14G079400	5	18,48	1301	1323	GAGUAGUGCAAUAUCAUGUGGU	Cleavage	(1 of 2) PTHR11119:SF29 - NUCLEOBASE-ASCORBATE TRANSPORTER 3
gma-miR171b-5p	Glyma.10G253200	5	16,913	1071	1092	UAGUCGUGCCAGUGUU-CGCCGU	Cleavage	(1 of 31) PTHR27002:SF122 - CYSTEINE-RICH RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 28-RELATED