



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Rafaela Marcondes Hasse

**Identificação de novos miRNAs em *Phaseolus vulgaris* e possíveis papéis na  
resposta a patógenos**

Florianópolis  
2023

Rafaela Marcondes Hasse

**Identificação de novos miRNAs em *Phaseolus vulgaris* e possíveis papéis na resposta a patógenos**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Franceli Rodrigues  
Kulcheski, Dra.  
Coorientadora: Sarah Kirchhofer de Oliveira Cabral.

Florianópolis

2023

Hasse, Rafaela Marcondes

Identificação de novos miRNAs em *Phaseolus vulgaris* e possíveis papéis na resposta a patógenos / Rafaela Marcondes Hasse ; orientadora, Francieli Rodrigues Kulcheski, coorientadora, Sarah Kirchhofer de Oliveira Cabral, 2023.

77 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. *Phaseolus vulgaris*. 3. microRNAs. 4. Interação planta-patógeno. I. Kulcheski, Francieli Rodrigues. II. Cabral, Sarah Kirchhofer de Oliveira. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Rafaela Marcondes Hasse

**Identificação de novos miRNAs em *Phaseolus vulgaris* e possíveis papéis na resposta a patógenos**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharela e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 29 de novembro de 2023.

Coordenação do Curso

**Banca examinadora**

Profa. Franceli Rodrigues  
Kulcheski, Dra.  
Orientadora

Profa. Talita da Silva Jeremias, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Guilherme de Toledo e Silva, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2023.

Dedico esse trabalho a minha avó Teca,  
que me incentivou até o fim a estudar.



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais por todo amor, apoio e suporte. Amo vocês, obrigada pelos abraços quando me viam cansada. Aos meus irmãos pelo carinho, afeto e palavras de incentivo. Obrigada por constantemente validar minha capacidade e disciplina. Aos amigos pelos momentos de descontração, desabafo e fofoca.

À minha orientadora, Profa. Franceli Rodrigues Kulcheski, pela presença e atenção constante, e por incentivar a participação em eventos para além de científicos. À Sarah Kirchhofer de Oliveira Cabral, pela coorientação e parceria dentro e fora do laboratório. Tive um crescimento gigante ao longo desses mais de dois anos no GBMoP.

Agradeço ao Centro Acadêmico de Biologia pela luta por melhores condições para vivenciar a graduação, e pela parceria durante a minha participação. Agradeço à coletiva Mítia Bonita por toda a luta e pelo aprendizado durante a minha curta participação.

E à minha vó Teca, que sempre se orgulhou de mim.

## RESUMO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) é uma cultura de relevância econômica e nutricional global, frequentemente afetada por diversos estresses bióticos. miRNAs são conhecidos pelo seu papel na regulação de interações planta-patógeno, especialmente durante o estabelecimento do patógeno e nas respostas de defesas da planta. Dada a importância de *P. vulgaris*, este estudo buscou identificar *in silico* novos miRNAs e seus transcritos alvos relacionados ao estresse biótico. Para selecionar miRNAs envolvidos na resposta planta-patógeno, uma extensa pesquisa foi realizada nas bases de dados Web of Science, Scielo, Pubmed, Wiley, ScienceDirect e Google Acadêmico, utilizando os termos-chave "microRNA" e "pathogen" e nomes de plantas da família Fabaceae. Para evitar redundância, excluímos os miRNAs de *P. vulgaris* já validados. Após a filtragem, as sequências restantes foram submetidas a uma análise blastN, com um mismatch permitido, para selecionar sequências altamente similares para a análise de precursores de miRNA. Sequências resultantes (de aproximadamente 200 nucleotídeos) foram submetidas a testes de RNAfold via os softwares ViennaRNA Web Services e UNAFold. Com base na análise de dobramento, foram identificados 19 novos genes de miRNAs em feijão. Para compreender melhor as funções biológicas dos miRNAs previstos e explorar os caminhos prospectivos de novos miRNAs, os transcritos alvo foram identificados utilizando a ferramenta psRNATarget. Posteriormente, os alvos foram investigados quanto ao seu envolvimento nos processos celulares vegetais. Entre os miRNAs pvu-MIR-65, pvu-MIR-190, pvu-MIR-393, pvu-MIR-396, pvu-MIR-477, pvu-MIR-482, pvu-MIR-2111, pvu-MIR-503 e pvu-MIR-10405, foram preditos 34 transcritos alvos relacionados à resposta a estresses bióticos, incluindo processos celulares como morte celular programada, fechamento estomático, espessamento da parede celular e regulação de diferentes fitormônios. Não foi previsto nenhum alvo relacionado à resposta imune para os miRNAs: pvu-MIR-61; pvu-MIR-159; pvu-MIR-168; pvu-MIR-1512 e pvu-MIR-4416. Não foi previsto nenhum alvo relacionado à resposta imune para os miRNAs: pvu-MIR-61; pvu-MIR-159; pvu-MIR-168; pvu-MIR-1512 e pvu-MIR-4416. Considerando a importância dessa cultura, a identificação destes miRNAs pode contribuir para pesquisas futuras que os utilizem como ferramentas para melhorar a resistência e a produtividade das culturas durante estresses bióticos.

**Palavras-chave:** *Phaseolus vulgaris*; microRNAs; interação planta-patógeno.

## ABSTRACT

Common bean (*Phaseolus vulgaris*) is a crop of global economic and nutritional relevance, frequently affected by various biotic stresses. MiRNAs are known for their role in regulating plant-pathogen interactions, especially during pathogen establishment and plant defense responses. Given the importance of *P. vulgaris*, this study sought to identify *in silico* new miRNAs and their target transcripts related to biotic stress. To select miRNAs involved in the plant-pathogen response, an extensive search was carried out in the Web of Science, Scielo, Pubmed, Wiley, ScienceDirect and Google Scholar databases, using the key terms "microRNA" and "pathogen" and plant names from the Fabaceae family. To avoid redundancy, we excluded already validated *P. vulgaris* miRNAs. After filtering, the remaining sequences were subjected to blastN analysis, with one mismatch allowed, to select highly similar sequences for miRNA precursor analysis. The resulting sequences (of approximately 200 nucleotides) were subjected to RNAfold testing via the online server ViennaRNA Web Services. Based on folding analysis, ten new miRNA genes were identified in beans. To better understand the predicted biological functions of miRNAs and explore prospective pathways of novel miRNAs, target transcripts were identified using the psRNATarget tool. Subsequently, the targets were investigated for their involvement in plant cellular processes. Among the miRNAs pvu-MIR-65, pvu-MIR-190, pvu-MIR-393, pvu-MIR-396, pvu-MIR-477, pvu-MIR-482, pvu-MIR-2111, pvu-MIR-503 and pvu-MIR-10405, 34 target transcripts related to the response to biotic stresses were predicted, including cellular processes such as programmed cell death, stomatal closure, cell wall thickening and regulation of different phytohormones. No target related to the immune response was predicted for the miRNAs: pvu-MIR-61; pvu-MIR-159; pvu-MIR-168; pvu-MIR-1512 and pvu-MIR-4416. No target related to the immune response was predicted for the miRNAs: pvu-MIR-61; pvu-MIR-159; pvu-MIR-168; pvu-MIR-1512 and pvu-MIR-4416. Considering the importance of culture, the identification of these miRNAs can contribute to future research that will use them as tools to improve crop resistance and productivity during biotic stresses.

**Keywords:** *Phaseolus vulgaris*; microRNAs; plant-pathogen interaction.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Biogênese de miRNAs .....	15
Figura 2 - Fluxograma da identificação dos candidatos a novos miRNAs de <i>P. vulgaris</i> . .....	22
Figura 3 - Estrutura secundária dos novos pre-miRNAs de <i>P. vulgaris</i> .....	23
Figura 4 – Vias de atuação dos novos miRNAs identificados em <i>P. vulgaris</i> e seus respectivos alvos envolvidos na resposta imune da planta. ....	33

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - MicroRNAs com a sua identificação original e a sua nova identificação em <i>P. vulgaris</i> .....	24
Quadro 2 - Sequências maduras e do precursor dos miRNAs determinados em <i>P. vulgaris</i> .....	26
Quadro 3 - Novos miRNAs de <i>P. vulgaris</i> identificados por predição <i>in silico</i> .....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGO	proteína Argonauta
CDS	Região de codificação (do inglês, <i>coding sequence</i> )
DAMP	Padrões moleculares associados a danos (do inglês <i>Damage-Associated Molecular Patterns</i> )
DCL1	proteína Dicer-like 1
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i> )
HYL1	proteína Hyponastic Leaves 1
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA (do inglês, <i>RNA-induced silencing complex</i> )
RNAi	RNA de interferência
miRNA	microRNA
pri-miRNA	miRNAs primário
pré-miRNA	Precursor de miRNA
RNA	Ácido Ribonucleico (do inglês, <i>ribonucleic acid</i> )
MFE	Mínima energia livre (do inglês, <i>minimum free energy</i> )
mRNA	RNA mensageiro
SE	proteína Serrate
siRNA	Pequeno RNA de interferência (do inglês, <i>small interfering RNA</i> )
sRNA-seq	Sequenciamento de pequenos RNAs (do inglês, <i>Small RNA Sequencing</i> )

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1	<i>PHASEOLUS VULGARIS</i> E ESTRESSES BIÓTICOS QUE ACOMETEM A CULTURA .....	13
1.2	MICRORNAS E SUA BIOGÊNESE .....	14
1.3	PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i> DE MIRNAS .....	16
1.4	PREDIÇÃO DE TRANSCRITOS ALVO DOS MIRNAS.....	16
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
3.1	PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i> DE NOVOS MIRNAS EM FEIJÃO .....	18
3.2	PREDIÇÃO DOS ALVOS.....	20
3.3	INVESTIGAÇÃO DAS VIAS BIOLÓGICAS DOS ALVOS DURANTE ESTRESSE BIÓTICO .....	20
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>35</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>36</b>
	<b>APÊNDICE A</b> .....	<b>41</b>
	<b>APÊNDICE B</b> .....	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 *PHASEOLUS VULGARIS* E ESTRESSES BIÓTICOS QUE ACOMETEM A CULTURA

Os grãos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) representam uma significativa fonte de proteínas, especialmente para a população latino-americana e de baixa renda (BARBOSA; GONZAGA, 2012). A Região Sul do Brasil é responsável por mais de 95% da produção nacional de feijão preto. Nessa região, a produção é majoritariamente composta por pequenas propriedades rurais de agricultores familiares. Para esses agricultores, o cultivo do feijão, assim como de outros produtos voltados para o consumo interno, representa a principal fonte de renda (NETO; SANTOS, 2018). No entanto, a colheita frequentemente coincide com períodos chuvosos, resultando em desafios de qualidade do grão devido a doenças, e como geralmente as colheitas cultivadas são em grandes populações geneticamente uniformes, se um patógeno virulento estiver presente e as condições ambientais forem propícias ao desenvolvimento da doença, o patógeno pode se espalhar rapidamente e a doença pode ser grave (KUROKI; FALK, 2020).

O uso de cultivares resistentes é considerado o método mais eficaz e ecologicamente responsável para controlar doenças de plantas (WILLOCQUET; SAVARY; YUEN, 2017). No entanto, é frequentemente difícil obter cultivares resistentes. O melhoramento tradicional de plantas é um processo demorado, há uma escassez de fontes apropriadas de resistência genética disponíveis para programas de melhoramento de plantas, podendo haver o surgimento de novos patógenos para os quais não se conhece resistência, além das plantas resistentes a patógenos conhecidos poderem não ser geneticamente compatíveis com as plantas que precisam de proteção. Mesmo quando há resistência genética eficaz, é possível que os patógenos evoluam para superar essa resistência (BROWN, 2015).

A obtenção de cultivares com resistência durável a patógenos é frequentemente um grande desafio. Assim, é crucial compreender os mecanismos moleculares subjacentes à defesa contra patógenos, a fim de auxiliar no aprimoramento genético do feijão. Um desses mecanismos é a interferência de RNA (RNAi), principalmente por meio de siRNAs (do inglês, *small interfering RNAs*) e miRNAs, sendo estes últimos considerados como a principal classe de pequenos

RNAs reguladores envolvidos na modulação da expressão gênica em plantas (KULCHESKI; MARGIS, 2017).

## 1.2 MicroRNAs E SUA BIOGÊNESE

Os microRNAs (miRNAs) constituem a principal classe de pequenos RNAs não codificantes, desempenhando um papel crucial na regulação pós-transcricional da expressão gênica em plantas e animais, atuando na clivagem ou na repressão traducional do RNA mensageiro (mRNA) (NAIR; MANICKAVELU, 2020). Defeitos na biogênese de miRNAs em *Arabidopsis* é letal para o embrião, e alterações na expressão de miRNAs durante o desenvolvimento pode causar efeitos severos no fenótipo (XU; CHEN, 2023). Seu envolvimento se estende a diversos processos celulares, com especial destaque para a interação planta-patógeno, onde desempenham um papel fundamental na defesa vegetal e no estabelecimento do patógeno (NAIR; MANICKAVELU, 2020). Atualmente, muitas sequências de precursores e formas maduras de miRNAs de plantas estão disponíveis em bancos de dados públicos de miRNAs. Em *P. vulgaris* existem 8 famílias de miRNAs depositadas no banco do miRBase (<https://mirbase.org>), e 54 famílias no banco de dados PmiREN (<https://www.pmiren.com>).

A biogênese dos miRNAs se inicia com a transcrição dos genes de miRNAs, genes *MIR*, resultando em transcritos iniciais chamados de miRNAs primários (pri-miRNAs) (GAO; NIE; WANG, 2021). Esses são capeados na extremidade 5' e poliadenilados na porção terminal 3', apresentando complementaridade de bases entre si, o que gera uma estrutura em formato de grampo (*hairpin*) imperfeita. Essa estrutura será processada no núcleo em um precursor de miRNA (pré-miRNA), sequência com um tamanho médio (em plantas) de aproximadamente 146 nucleotídeos (THAKUR *et al.*, 2011), conhecido como estrutura *stem-loop*. Em plantas, tanto os pri-miRNAs quanto os pré-miRNAs são processados no núcleo por uma enzima do tipo RNase III denominada DICER-LIKE 1 (DCL1) (XU; CHEN, 2023). As proteínas HYPOPLASTIC LEAVES 1 (HYL1) e SERRATE (SE) associam-se a DCL1 para processar o pri-miRNA em pré-miRNA, formando um centro de processamento nuclear conhecido como corpos-D (do inglês, *D-bodies*) (XIE *et al.*, 2021).

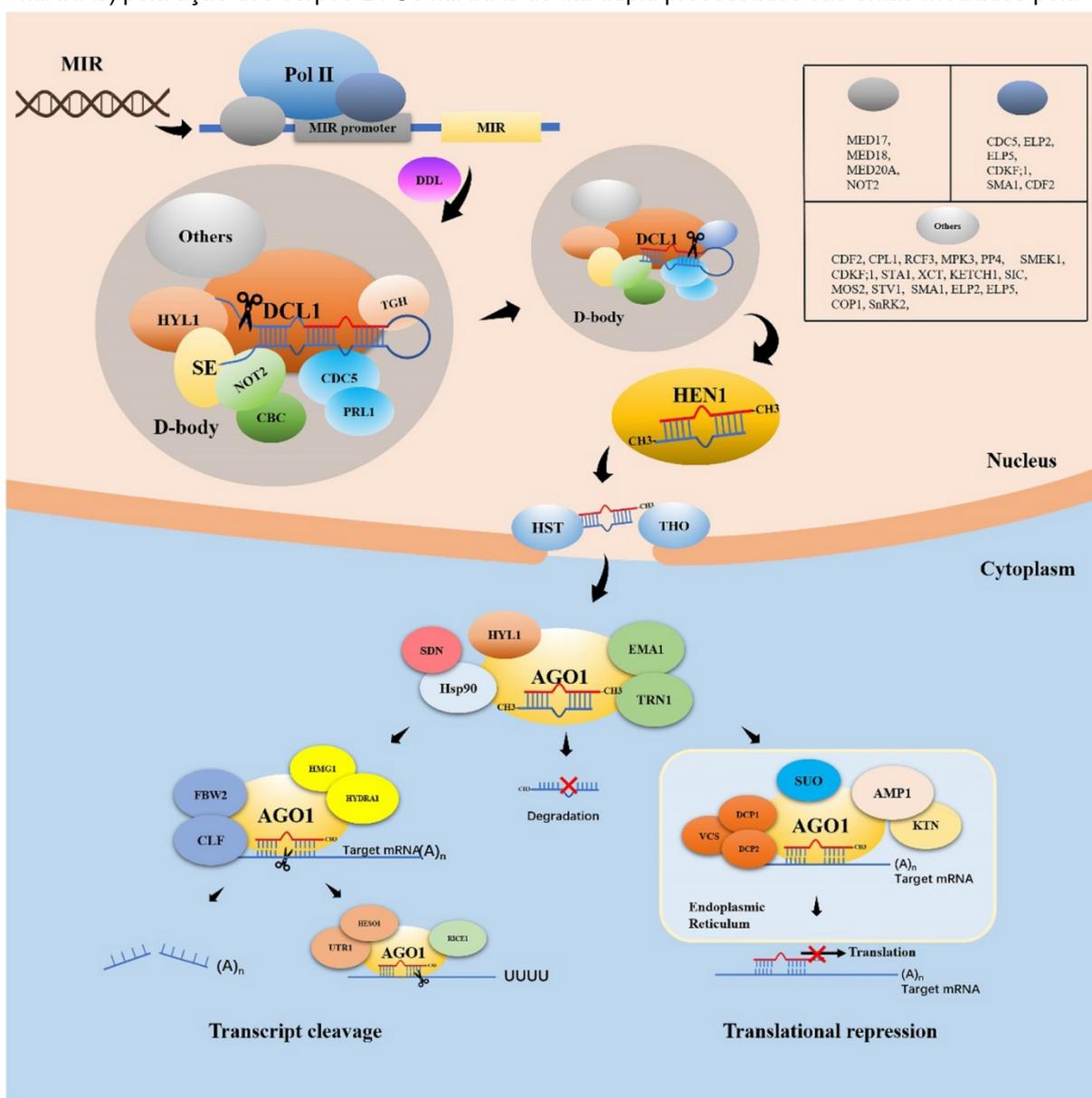
Posteriormente, os pré-miRNAs são clivados por DCL1 e HYL1, gerando um duplex de miRNA. Ainda no núcleo, o duplex metilado associa-se a proteína

ARGONAUTA (AGO) formando o complexo silenciador induzido por miRNA (miRISC) (BOLOGNA *et al.*, 2018). A fita guia se hibridiza com o mRNA alvo e é selecionada com base na menor estabilidade genômica em 5' (LIU *et al.*, 2017). Em condições de estresse específicas ou em tecidos particulares, a fita passageira pode ser carregada em uma proteína AGO e atuar na repressão gênica (XU *et al.*, 2018).

Figura 1 – Biogênese de miRNAs

Fonte: Gao, Nie e Wang, 2021.

Legenda: Diagrama da biogênese de miRNAs e sua via efetora em plantas. Os miRNAs são transcritos em miRNAs primários (pri-miRNAs) e depois processados em miRNAs precursoras (pré-miRNAs) pela ação dos corpos-D. Os miRNAs de fita dupla processados são então metilados pela



metilase Hua Enhancer (HEN1) e transportados do núcleo para o citoplasma pela proteína HASTY (HST). O miRNA maduro resultante pode reduzir a expressão gênica ao se incorporar na proteína Argonauta 1 (AGO1), que se combina com outras proteínas para formar o complexo de silenciamento RISC. O RISC tem duas formas de ação, uma é a clivagem, a outra é a repressão da tradução.

### 1.3 PREDIÇÃO *IN SILICO* DE miRNAs

Para que as sequências de pré-miRNA sejam processadas com precisão em um miRNA maduro, elas devem seguir determinados padrões, como os descritos por Axtell e Meyers (2018) para miRNAs de plantas: i) o miRNA e o miRNA anti-senso devem derivar de braços opostos da estrutura em grampo; ii) o tamanho do precursor deve ser inferior a 300 nucleotídeos; iii) o emparelhamento de bases entre o miRNA e o miRNA anti-senso é restrito a cinco ou menos incompatibilidades, e destas incompatibilidades, menos de três devem ser em bolhas assimétricas; iv) a sequência madura deve ser maior que 20 nucleotídeos e menor que 24 nucleotídeos; e v) Para a anotação de novos miRNAs, a sua expressão deve ser observada por sRNA-seq de alto rendimento em pelo menos duas replicatas biológicas. As anotações baseadas em homologia são provisórias, enquanto se aguarda o cumprimento real de todos os critérios por sRNA-seq (ZHAO *et al.*, 2021b).

Na literatura é muito comum utilizarem programas como o RNAfold pela interface ViennaRNA Web Services para testarem as estruturas em grampo, e analisar esses critérios (CORRÊA, 2023; DE SOUSA CARDOSO *et al.*, 2016; GUO *et al.*, 2022; KOHLI *et al.*, 2014; MALHOTRA *et al.*, 2022; MATHUR; NAIR; KADDOO, 2020). Conforme a probabilidade de emparelhamento de pares de bases pelo modelo de mínima energia livre (MFE, do inglês, *minimum free energy*), o RNAfold gera uma imagem colorida, onde se tem uma ideia visual das probabilidades de emparelhamento de cada base da sequência precursora. A escala de cores vai de vermelho a azul, com vermelho significando a probabilidade completa e azul nenhuma probabilidade. O gradiente de cores representa as probabilidades intermediárias.

Quando se verifica no programa uma estrutura em grampo perfeita, com a sua sequência senso madura em um braço da haste, e a sequência anti-senso no braço oposto, então pode se dizer desse pequeno RNA não codificante um bom candidato a novo miRNA.

### 1.4 PREDIÇÃO DE TRANSCRITOS ALVO DOS miRNAs

O complexo miRISC regula a expressão de um gene alvo através de dois mecanismos diferentes, a repressão traducional e a clivagem endonucleolítica do

mRNA. A clivagem endonucleolítica do mRNA ocorre durante a sua transcrição, reduzindo os níveis do mRNA-alvo expressos, enquanto a repressão traducional bloqueia o recrutamento do ribossomo (quando o sítio alvo é uma região 5' não traduzida), ou o seu movimento (quando o sítio alvo é uma fase de leitura aberta), assim reduzindo os níveis de tradução da proteína (SONG *et al.*, 2019). A forma em que a expressão gênica será regulada, depende do grau de complementariedade entre o miRNA e seu sítio alvo (PU *et al.*, 2019).

A complementariedade entre o miRNA e o sítio alvo determina a estabilidade do duplex miRNA:mRNA, principalmente os nucleotídeos na posição 2 a 7, chamada de região *seed*, portanto, é utilizada como uma característica chave para a análise do gene alvo (TYAGI *et al.*, 2019). A análise filogenética de miRNAs entre espécies também valida que os primeiros nucleotídeos são conservados e muitas vezes funcionam como determinantes do reconhecimento do alvo. Portanto, a região *seed* (do 2º ao 13º nucleotídeo do miRNA) tem sido enfatizada na análise de alvos de miRNA em plantas e animais (AXTELL, 2013).

A melhor forma de prever o alvo de um miRNA é por predição computacional, seguido por validação experimental dessas interações miRNA:mRNA. Na literatura, é muito utilizado o programa psRNATarget (<https://www.zhaolab.org/psRNATarget/>) para prever os transcritos alvos e o mecanismo da regulação da expressão gênica (BAO *et al.*, 2018; CORRÊA, 2023; LI *et al.*, 2023; MALHOTRA *et al.*, 2022; PASARI *et al.*, 2023; PATWA *et al.*, 2019). Em comparação aos principais programas de predição de alvos de miRNAs em plantas, o psRNATarget foi selecionado por seguir os seguintes critérios: permitir bolhas (nucleotídeos desemparelhados em apenas uma fita); ter um sistema de pontuação mais rígido na região *seed* (entre o 2º e o 13º nucleotídeo); possibilitar a multiplicidade de alvos; levar em conta aspectos de conservação das sequências; detectar inibição traducional; e ser um *software* baseado na *web*, com uma interface *user-friendly*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo identificar novos miRNAs nesta espécie, bem como seus respectivos alvos através de uma abordagem *in silico*. Adicionalmente buscou-se desvendar possíveis vias de atuação destes possíveis genes às respostas a estresse biótico na espécie abordada.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar miRNAs conservados em Fabaceas relacionados a interação planta-patógeno;
- Verificar a ocorrência dessas sequências no genoma do feijão;
- Identificar as sequências precursoras de miRNAs candidatos no genoma do feijão;
- Realizar a predição dos alvos dos novos miRNAs identificados;
- Investigar o envolvimento das proteínas-alvo preditas em processos de resposta a estresses bióticos.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 PREDIÇÃO *IN SILICO* DE NOVOS miRNAs EM FEIJÃO

Devido à falta de atualização nos bancos de dados de miRNAs de plantas, e para a garantia que os miRNAs relacionados a patógenos se tratavam de miRNAs diferencialmente expressos, vindos de experimentos com estresse biótico, foi preciso fazer uma busca bibliográfica prévia. Então, foi realizada uma busca bibliográfica, a fim de encontrar os microRNAs que já haviam sido previamente identificados e descritos em outras plantas da família Fabaceae, envolvidos com a resposta a estresse biótico. O levantamento de dados foi realizado nas bases de dados online Google Acadêmico, PubMed, Scielo, ScienceDirect, Web of Science e Wiley. Para a realização das buscas foi utilizada a combinação de três termos: “*microRNA*”,

“*pathogen*”, e o nome de outras espécies de Fabaceae, usando seu nome científico, ou seu nome popular em inglês. Foram selecionados trabalhos publicados a partir de 2001 até junho de 2023. Apenas artigos científicos foram utilizados. Os artigos foram selecionados de acordo com o título e o resumo, excluindo aqueles que não se tratavam de estresse biótico.

A partir dos miRNAs encontrados na literatura, foram selecionadas as sequências maduras e utilizadas como “isca” para realizar um blastN nos bancos de dados de miRNAs miRBase (<https://www.mirbase.org/>) e PmiREN (<https://pmiren.com/>), selecionando somente o genoma de *P. vulgaris* para a análise. Desta análise, miRNAs que já haviam sido validados como miRNAs de *P. vulgaris* foram eliminados para as análises posteriores. As sequências dos miRNAs restantes foram submetidas a um blastN no genoma do feijão (versão 442\_v2.1.) depositado no banco de genomas vegetais Phytozome 13 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>).

Sequências de miRNAs maduro com alta similaridade, isto é, as que continham apenas uma incompatibilidade no pareamento nucleotídico, foram selecionadas para a avaliação dos precursores. Assim, a partir dos sítios de pareamento foram selecionadas sequências com cerca de 200 nucleotídeos (100 nt a montante a 100 à jusante da sequência de miRNA maduro) foram filtradas para testes de dobramento de RNA.

Para verificar se as sequências candidatas a precursores possuíam os critérios para excisão precisa do miRNA maduro, todas tiveram sua estrutura secundária gerada a partir do programa de dobramento RNAfold pelo servidor online ViennaRNA Web Services (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>), e pelo UNAFold (<http://www.unafold.org/>). Após a obtenção da estrutura secundária no modelo de MFE, as estruturas em grampo ou também conhecidas por *stem-loop*, que se encaixavam nos critérios estabelecidos por Axtell e Meyers (2018), foram consideradas bons candidatos a novos miRNAs em feijão.

Foi então obtido dados sobre os novos miRNAs de *P. vulgaris* identificados por predição *in silico*, como o tamanho em nucleotídeos da sequência madura e da precursora, de que cromossomo a sequências provinham, o início e o fim do *locus* da sua sequência precursora, qual a fita de DNA (+ ou -), em qual braço a sequência madura se encontra (5p ou 3p), e de qual região do genoma provém a sua sequência precursora (região CDS, intergênica ou intrônica).

### 3.2 PREDIÇÃO DOS ALVOS

Para obter uma melhor compreensão das funções biológicas dos miRNAs previstos, análises de predição de transcritos alvo dos novos miRNAs foram realizadas usando o software psRNATarget. A versão 2017 do programa foi usada para identificar potenciais genes-alvo. O genoma de *P. vulgaris* utilizado foi o do DFCI Gene index, Unigene na versão 4.

A penalidade para o pareamento *Woble* (G=U) foi de 0,5 e 1 para outros *mismatches*. Foi adicionado penalidade maior que 1,5 para a região *seed*, e somente 2 *mismatches* permitidos nesta região, sendo considerados entre os nucleotídeos 2 a 13. Bolhas foram permitidas, mas com uma penalidade de 2 pontos por bolha. A região de inibição traducional considerada foi entre os nucleotídeos 10 e 11. O *cut-off* para seleção de possíveis alvos foi de 3. Após o nucleotídeo 19 do miRNA, os *mismatches* pararam de ser pontuados.

### 3.3 INVESTIGAÇÃO DAS VIAS BIOLÓGICAS DOS ALVOS DURANTE ESTRESSE BIÓTICO

Os alvos identificados foram investigados quanto ao seu envolvimento em processos celulares vegetais e quanto à homologia com outras espécies vegetais. Os seguintes bancos de dados foram usados para esta pesquisa: Phytozome, PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>) e UniProt (<https://www.uniprot.org/>). Proteínas sem definição disponível nos bancos de dados utilizados, foram analisadas quanto a sua homologia em outras espécies. Então, para a identificação do alvo, foram selecionadas proteínas com alta homologia, ou seja, acima de 80% de similaridade.

Após a identificação do transcrito alvo, foi realizada uma análise massiva na literatura nos respectivos bancos de dados: Google Acadêmico, PubMed, Scielo, ScienceDirect, Web of Science e Wiley. Os termos utilizados para as buscas foram os nomes das proteínas identificadas e suas possíveis variações. Buscou-se entender o envolvimento do transcrito alvo com funções celulares, com foco em cenários de estresse biótico. Posteriormente, foi predita a participação dos miRNAs e seus alvos em vias relacionadas à resposta a patógenos em plantas.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As buscas na bibliografia resultaram em 29 artigos científicos. As publicações incluídas no estudo abrangeram 9 espécies de plantas da família Fabaceae, foram 14 publicações com *Glycine max*, seis com *Arachis hypogaea*, três com *Cajanus cajan* e duas publicações com a espécie *Cicer arietinum*, assim como com as espécies *Cajanus scarabaeoides* e *Vigna unguiculata*. Entre as espécies *Arachis glabrata*, *Medicago truncatula* e *Vigna mungo* só houve uma publicação incluída no estudo.

Nos artigos estudados, foram identificadas 18 espécies de patógenos, entre uma bactéria, oito fungos, uma lagarta, dois nematóides, um oomiceto, e cinco vírus, são eles: *Ascochyta blight*, *Aspergillus flavus*, *Cowpea severe mosaic virus (CPSMV)*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium udum*, *Fusarium virguliforme*, *Groundnut bud necrosis virus (GBNV)*, *Helicoverpa armigera*, *Heterodera glycines*, *Meloidogyne incognita*, *Mungbean yellow mosaic virus (MYMV)*, *Mungbean yellow mosaic India virus (MYMIV)*, *Phakopsora pachyrhizi*, *Phytophthora sojae*, *Ralstonia solanacearum*, *Sclerotium rolfsii*, *Soybean mosaic virus (SMV)* e *Verticillium albo-atrum*. O patógeno mais presente foi *Phytophthora sojae*, incluso em seis dos 29 estudos. Um dos estudos coletou amostras de Podridão da vagem do amendoim à campo, sem caracterizar qual patógeno, mas por ter sido realizado na China, pode se inferir que foram espécies de *Fusarium spp.* e *Pythium spp.* principalmente (WANG *et al.*, 2020).

No total, foram 1477 miRNAs diferencialmente expressos encontrados na literatura, correspondente a miRNAs que respondiam a patógenos em plantas da família Fabaceae. Após a eliminação das sequências redundantes, esse número caiu para 616 miRNAs. 149 sequências foram eliminadas por se tratarem de miRNAs presentes nos bancos de dados de miRNAs de plantas para o feijoeiro, portanto já validados no genoma do *P. vulgaris*. Das 467 sequências restantes, 250 foram encontradas dando *match* no genoma do feijão. Todas as 250 sequências que foram encontradas com alta similaridade no genoma do feijão, foram extraídas para testes de RNAfold.

Após os testes de dobramento das sequências candidatas a pré-miRNAs, pode-se conferir 19 estruturas secundárias que seguiam os critérios estabelecidos para a anotação de novos miRNAs em plantas. Na Figura 3 se confere a estrutura secundária dos 19 novos miRNAs preditos. Após isso, as 19 sequências foram renomeadas para discussão no presente trabalho. A identificação dos miRNAs no

artigo que os sequenciaram, o DOI do artigo de origem, e agora a sua nova identificação para sequências encontradas no genoma do feijão, constam no quadro 1.

Figura 2 - Fluxograma da identificação dos candidatos a novos miRNAs de *P. vulgaris*.

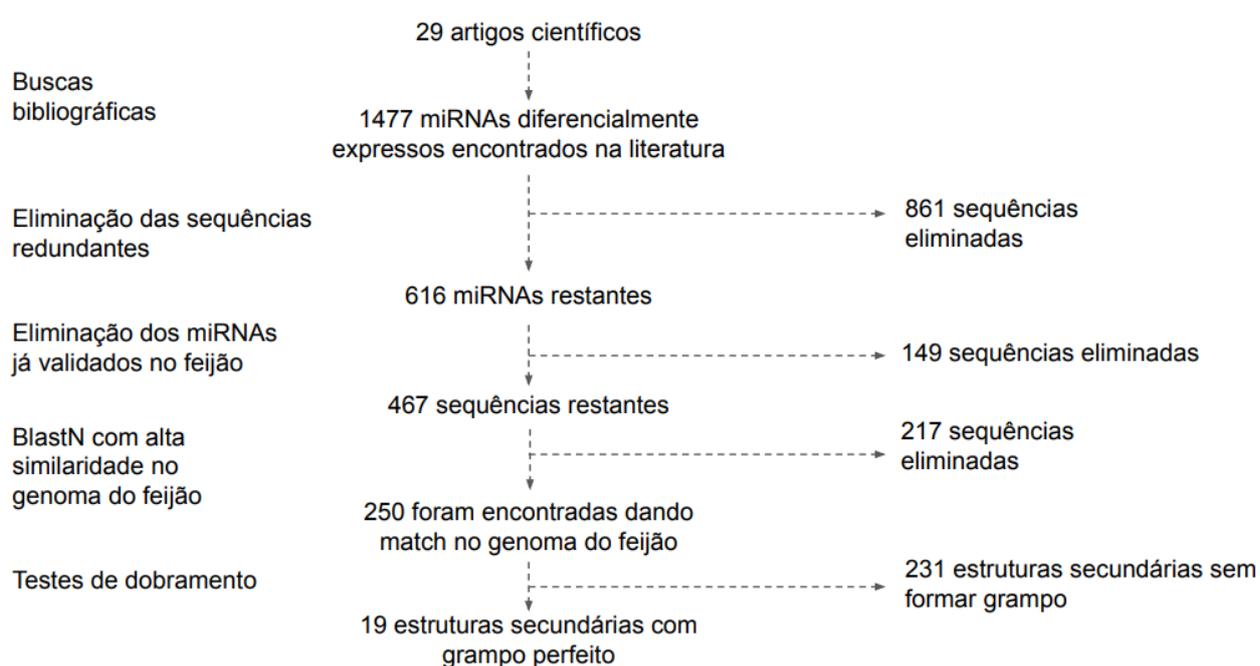


Figura 3 - Estrutura secundária dos novos pre-miRNAs de *P. vulgaris*.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Estrutura secundária dos 19 novos miRNAs encontrados em *P. vulgaris*. RNAfold. Em verde está marcado a sequência madura de cada miRNA correspondente. Estruturas preditas com o software RNAfold.

Quadro 1 - MicroRNAs conservados em outras espécies de Fabaceae identificados em *P. vulgaris*.

<b>Identificação no artigo de origem</b>	<b>Artigo de origem</b>	<b>Identificação em <i>P. vulgaris</i></b>	<b>Espécie de Fabaceae</b>	<b>Estresse biótico realizado</b>
novel-ahy-miR61-5p	XU <i>et al.</i> , 2022	pvu-MIR-61	<i>Arachis hypogaea</i>	<i>Sclerotium rolfsii</i>
novel-ahy-miR65-5p	XU <i>et al.</i> , 2022	pvu-MIR-65	<i>Arachis hypogaea</i>	<i>Sclerotium rolfsii</i>
gma-miR159d	GUO <i>et al.</i> , 2022	pvu-MIR-159	<i>Glycine max</i>	<i>Phytophthora sojae</i>
ahy-miR168a-3p	ZHAO <i>et al.</i> , 2020	pvu-MIR-168	<i>Arachis hypogaea</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
novel-ahy-miR190-5p	XU <i>et al.</i> , 2022	pvu-MIR-190	<i>Arachis hypogaea</i>	<i>Sclerotium rolfsii</i>
ahy-miR390a	ZHAO <i>et al.</i> , 2020	pvu-MIR-390	<i>Arachis hypogaea</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
gma-miR393c-3p	GUO <i>et al.</i> , 2022	pvu-MIR-393a	<i>Glycine max</i>	<i>Phytophthora sojae</i>
gma-miR393c-3p	GUO <i>et al.</i> , 2022	pvu-MIR-393b	<i>Glycine max</i>	<i>Phytophthora sojae</i>
gma-miR396d	MALHOTRA <i>et al.</i> , 2022	pvu-MIR-396a	<i>Cajanus sp.</i>	<i>Helicoverpa armigera</i>
ama-miR396-3p	MALHOTRA <i>et al.</i> , 2022	pvu-MIR-396b	<i>Cajanus sp.</i>	<i>Helicoverpa armigera</i>
ppe-miR396a	WANG <i>et al.</i> , 2020	pvu-MIR-396c	<i>Arachis hypogaea</i>	Provavelmente <i>Fusarium sp.</i> ou <i>Pythium sp.</i>
vvi-miR477	WANG <i>et al.</i> , 2020	pvu-MIR-477	<i>Arachis hypogaea</i>	Provavelmente <i>Fusarium sp.</i> ou <i>Pythium sp.</i>
gma-miR482a-5p	MALHOTRA <i>et al.</i> , 2022	pvu-MIR-482	<i>Cajanus sp.</i>	<i>Helicoverpa armigera</i>
gma-miR1512a-3p	GUO <i>et al.</i> , 2022	pvu-MIR-1512	<i>Glycine max</i>	<i>Phytophthora sojae</i>
gma-miR2111	RAMESH <i>et al.</i> , 2017	pvu-MIR-2111	<i>Glycine max</i>	<i>Mungbean yellow mosaic India virus</i>

gma-miR4416a	MALHOTRA <i>et al.</i> , 2022	pvu-MIR-4416	<i>Cajanus sp.</i>	<i>Helicoverpa armigera</i>
gma-miR5037a	ZHAO <i>et al.</i> , 2015	pvu-MIR-5037a	<i>Glycine max</i>	<i>Phytophthora sojae</i>
gma-miR5037a	ZHAO <i>et al.</i> , 2015	pvu-MIR-5037b	<i>Glycine max</i>	<i>Phytophthora sojae</i>
gma-miR10405a;b;c;d;e	ZHAO <i>et al.</i> , 2015	pvu-MIR-10405	<i>Glycine max</i>	<i>Phytophthora sojae</i>

Fonte: Elaborado pela autora.

Quadro 2 – Novas sequências maduras e precursoras dos miRNAs identificados em *P. vulgaris*.

Identificação do miRNA	Sequência do miRNA maduro	Sequência do Precursor	Energia livre mínima (kcal/mol)
pvu-MIR-61	GAUAUUGGUGCGGUUCAAU	GAUAUUGGUGCGGUUCAAUCAGAAGGCAGUGUUUUGUUAUCCAAAACUCUGUGUUGUUUGAU UGAGCCGUGCCAAUAUCAC	-46.60
pvu-MIR-65	GGAGGCAGCGGUUCAUCGAUC	GGAGGCAGCGGUUCAUCGAUCUCUCCUGAAUUUGGCUGUGGAAGAACACAAAACAAGAAUC GGUCGAUAAACCUCUGCAUCCAG	-30.40
pvu-MIR-159	AGCUGCUUAGCUAUGGAUCCC	AGCUGCUUAGCUAUGGAUCCCACAGUUCUACCCAUCAGCAUGUUUUGUGGUAGUCUUGUGGC UUCCAUAUCUGGGGAGCUUC	-36.50
pvu-MIR-168	CCCGCCUUGCAUCAACUGAAU	UCGCUUGGUGCAGGUCGGGAACCUGUUUUUGCGCGAAAUGGUGGAGUGGUUGCCGGCGGCGA AUUGGAUCCCGCCUUGCAUCAACUGAAU	-36.60
pvu-MIR-190	AGGUAAUUGGCGCGCCUCAAUU	AGGUAAUUGGCGCGCCUCAAUUUGAAGACAUGGUUAAACAGGAAAACCAACCAUGUGGUUUUAA UUGAGCCGCGUCAAUUAUCUCA	-37.50
pvu-MIR-390	AAGCUCAGGAGGGAUAGCGCC	AAGCUCAGGAGGGAUAGCGCCAUGAUUCUCACAUCAUAGUGUUCUUUGGCGCUAUCUAUCCU GAGUUUCA	-36.70
pvu-MIR-393a	AUCAUGCUAUCCCUUUGGAUU	UCCAAAGGGAUCGCAUUGAUCCCAAUUCAGAUUUUAUAAAUUUUUCCUCCUUCUUUUCU UAAUAUUUGGGAUCAUGCUAUCCCUUUGGAUU	-37.20
pvu-MIR-393b	AUCAUGCUAUCCCUUUGGAU	CCAAAGGGAUCGCAUUGAUCCAAAUCCAACCUCUCAUAUUCUCUCUCCACUCACAGUAU UUGGGAUCAUGCUAUCCCUUUGGAU	-27.27
pvu-MIR-396a	AAGAAAGCUGUGGGAGAAUAUGGC	CAUGCUIUCCACAGCUUCUUGAACUUCUUCUGCAUCUUAUAUCUCUCCGCCUCCAGGAUU UUAAGCCCUAGAAGCUCAGAAAGCUGUGGGAGAAUAUGGC	-40.60
pvu-MIR-396b	AAGCUCAAGAAAGCUGUGGGA	CCACAGCUUCUUGAACUUCUUCUGCAUCUUAUAUCUCUCCGCCUCCAGGAUUUUAAGCCCU AGAAGCUCAGAAAGCUGUGGGA	-33.60
pvu-MIR-396c	UCCACAGCUUUCUUGAAC	UCCACAGCUUUCUUGAACUUCUUCUGCAUCUUAUAUCUCUCCGCCUCCAGGAUUUUAAGCCC UAGAAGCUCAGAAAGCUGUGGGAG	-34.10
pvu-MIR-477	UCCCUCAAAGGCUUCCAGUA	UCCCUCAAAGGCUUCCAGUAUUCAGUAAGCUAAGUUACUUGAAUGCUGGAAGUUUUUGAAGG AAU	-36.00
pvu-MIR-482	AGAAUUUGUGGGAAUGGGCUGA	AGAAUUUGUGGGAAUGGGCUGAUUGGGAAGCAAUGAAAACUCAAGCAAUUGUGUCUACAUUU UCUUCCAAUUCGCCCAUCCUAUGAUUUCUGA	-43.40
pvu-MIR-1512	GCUUUUAGAAUUUCAGUUAUG	UACUGAAUAUUCUUAAGCCUACCAUUGUUAAGGCAACAUCAUUGUGAUGUGAAAAUUGG GAAUGCUUUUAGAAUUUCAGUUAUG	-30.00
pvu-MIR-2111	GUCCUUGGGAUGCAGAUUA	AUCUGCAUCCUGAGGUUAGAACAUAUUUUUAUUGUGUCUAGUCCUUGGGAUGCAGAUUA	-33.30

pvu-MIR-4416	ACGGGUCGCUCUCACCUAG	GGGUGAGAGAUACGCGUAUCCAAUGCUUAGAUACGGGUCGCUCUCACCUAG	-26.30
pvu-MIR-5037a	CCUCAAGGCUUCCACUACUG	CCUCAAGGCUUCCACUACUGCAUCUUUCUGUCGGUUAAUAUCCUGAAACAAGUAGUAGUG GAGGCUUGAAAGGUC	-30.70
pvu-MIR-5037b	CCUCAAGGCUUCCACUACU	CCUCAAGGCUUCCACUACUCUAUAUUUCAGUCAUCAAUAUGGAGUAUGGAGGAGUGGACU UUUGAGGCC	-33.90
pvu-MIR-10405	UUGUUUCUUAUAAAAAGGAC	CCUUUUACAAGAAGCAAUAACUGUUUUUAACAUUUCCAUUUGUUUCUUAUAAAAAGGAC	-18.40

Fonte: Elaborado pela autora. Legenda: A estabilidade de uma estrutura é calculada a partir do modelo de Mínima energia livre (MFE, do inglês, *minimum free energy*), onde é escolhido computacionalmente a estrutura com a menor energia livre entre todas as estruturas possíveis calculadas. Mínima energia livre é o menor valor em kcal/mol, atingido.

A sequência dos miRNAs maduros encontrados no feijão, junto com a sua sequência precursora proposta, constam no Quadro 2. No quadro, também constam dados sobre a Energia livre mínima, calculada em Kcal/mol.

Dos miRNAs recém-identificados, 7 deles foram identificados no cromossomo 8, 5 deles no cromossomo 3, 2 no cromossomo 1 e somente 1 para os cromossomos 11, 6, 5, 4 e 2. 10 miRNAs derivam do braço 5p de sua sequência precursora e 9 provém do braço 3p. Os miRNAs pvu-MIR-4416, pvu-MIR-1512 e pvu-MIR-61 vem da fita anti-senso (-) do genoma, os outros 16 miRNAs vem da fita senso (+). A identificação dos miRNAs preditos está compilada no Quadro 3, bem como sua sequência e características de seu precursor, como tamanho e localização no genoma da espécie.

Quadro 3 – Caracterização dos novos miRNAs de *P. vulgaris* identificados por predição *in silico*.

Identificação do miRNA	miRNA Maduro	Cromossomo	Pre-miRNA					Região
	Tamanho (nt)		Início	Fim	Tamanho (nt)	Senso	Braço	
pvu-MIR-61	20	Pv03	12716664	12716744	81	-	5p	intergênico
pvu-MIR-65	21	Pv03	40295095	40295179	85	+	5p	CDS
pvu-MIR-159	21	Pv04	45422623	45422704	82	+	5p	CDS
pvu-MIR-168	21	Pv02	26145340	26145429	90	+	3p	CDS
pvu-MIR-190	21	Pv11	11457454	11457536	83	+	5p	CDS
pvu-MIR-390	21	Pv06	18614646	18614715	70	+	5p	intergênico
pvu-MIR-393a	21	Pv08	57768472	57768565	94	+	3p	CDS
pvu-MIR-393b	20	Pv01	49238272	49238358	87	+	3p	CDS
pvu-MIR-396a	24	Pv03	38943325	38943427	103	+	3p	CDS
pvu-MIR-396b	21	Pv03	38943334	38943418	85	+	3p	CDS
pvu-MIR-396c	18	Pv03	38943333	38943419	87	+	5p	CDS
pvu-MIR-477	20	Pv08	614860	614924	65	+	5p	intrônico
pvu-MIR-482	22	Pv08	777229	777324	96	+	5p	CDS
pvu-MIR-1512	21	Pv08	1370206	1370296	91	-	3p	intergênico
pvu-MIR-2111	19	Pv08	13414857	13414917	61	+	3p	intergênico
pvu-MIR-4416	19	Pv01	38594999	38595053	55	-	3p	
pvu-MIR-5037a	21	Pv08	594243	594319	77	+	5p	intergênico
pvu-MIR-5037b	21	Pv08	607835	607905	71	+	5p	CDS
pvu-MIR-10405	20	Pv05	37078308	37078368	61	+	3p	intrônico

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: CDS é a abreviatura de Região de codificação (do inglês, *coding sequence*). O símbolo de mais (+) representa a fita senso, e o símbolo de menos (-) representa a fita anti-senso.

Após a análise de dobramento, procedeu-se uma caracterização mais detalhada desses 19 miRNAs e dos seus transcritos alvos, classificando-os quanto a sua relação com processos celulares.

O pvu-MIR-65 foi predito tendo 6 alvos relacionados à resposta da planta a estresses bióticos. Um de seus alvos preditos foi uma proteína relacionada a palmitoiltransferase, enzima que atua na síntese *de novo* de esfingolipídios. Os esfingolipídeos em plantas participam da morte celular programada na resposta de hipersensibilidade (SAUCEDO-GARCÍA *et al.*, 2011). Outro alvo predito do pvu-MIR-65, foi uma isocorismato sintase, enzima que produz ácido salicílico a partir de corismato (WILDERMUTH *et al.*, 2001). Também é predito que esse miRNA tenha como alvo uma triptofano sintase, proteína que já foi indicada como importante para a síntese de precursores de compostos metabólicos secundários relacionados à defesa das plantas, além de serem induzidos por patógenos (PRABHUKARTHIKEYAN *et al.*, 2017). Outra proteína alvo predita é a Antígeno intracitoplasmático de células T 1 (TIA-1), considerada pró-apoptótica e que também influencia o metabolismo de RNAs (FÖRCH; VALCÁRCEL, 2001). Uma proteína relacionada à autofagia, a Proteína semelhante à autofagia 18 F (ATG18f) também foi predita (LEARY *et al.*, 2019). O pvu-MIR-65 também teve como alvo predito uma beta-caroteno dioxigenase, enzima descrita na via de biossíntese do ácido abscísico (WEI *et al.*, 2022).

O pvu-MIR-190 teve apenas um alvo predito relacionado à resposta da planta contra patógenos, a proteína relacionada a multi-cobre oxidase tipo 1, que está envolvida na biossíntese da justicidina B, proteína relatada com atividade antifúngica (GERTSCH *et al.*, 2003).

pvu-MIR-390 foi predito tendo 8 transcritos alvos relacionados à resposta da planta a estresses bióticos, sendo 3 deles proteínas com domínio LRR, que reconhecem proteínas efetoras de patógenos (CAPLAN; PADMANABHAN; DINESH-KUMAR, 2008). Uma Proteína relacionada a fosfatase 2C 12, foi predita, e já foi associada a resistência a doenças através da via biossintética da melatonina (ZHAO *et al.*, 2023). O pvu-MIR-390 também teve como alvo predito uma Tirosina-proteína quinase 1 semelhante a PTI1, que é um candidato a gene de resistência ao vírus do mosaico do trigo (LIU *et al.*, 2020). Outro alvo predito do pvu-MIR-390 que é candidato a gene de resistência é o receptor de fitossulfocina 2 em algodão (MEHANATHAN *et al.*, 2018). O pvu-MIR-390 também tem como alvo predito uma proteína contendo domínio *zinc finger*, família de proteínas com múltiplas atividades celulares, inclusive

na resistência a estresse biótico (GUPTA *et al.*, 2012). Por último, o pvu-MIR-390 tem como alvo predito um receptor de etileno, hormônio vegetal que funciona como uma molécula de sinalização após o estresse biótico ocorrer (NATALINI; PALMA, 2023).

Para o pvu-MIR-393 foi predito somente uma Lignoceroil-CoA sintase, enzima envolvida na biossíntese da cera cuticular, que compõe a primeira linha de defesa da planta a estressores (LEWANDOWSKA; KEYL; FEUSSNER, 2020).

pvu-MIR-396 foi predito tendo três alvos relacionados à resposta da planta a estresses bióticos. Uma proteína contendo domínio LRR; uma quinase receptora de lectina tipo L, que tem um papel na sinalização de jasmonato, fechamento estomático em resposta a patógeno, e diminui a resposta a ácido abscísico (WANG; BOUWMEESTER, 2017); e uma proteína que detecta monossacarídeos, que são moléculas sinalizadoras na resposta imune (MACWILLIAMS *et al.*, 2023).

pvu-MIR-477 foi predito tendo como alvo uma proteína DELLA, envolvida na resposta de defesa da planta ao restringir o crescimento da planta sob condições de estresse, desviando recursos da planta para as respostas de defesa (VERMA; RAVINDRAN; KUMAR, 2016). O miRNA também tem como alvo predito uma triptofano sintase, assim como o pvu-MIR-65.

O Pvu-MIR-482 teve cinco alvos preditos envolvidos nas respostas de defesa da planta. Uma das proteínas alvo foi uma pectinesterase, proteína que tem um papel importante no espessamento da parede celular e aumenta a resposta induzida por padrões moleculares associados a danos (DAMP, do inglês *Damage-Associated Molecular Patterns*) (KLOTH *et al.*, 2019). O miRNA também foi visto tendo como alvo um fator de transcrição SHINE, que tem um papel na formação da cutícula e na regulação do desenvolvimento estomático, que por sua vez possuem ação na resistência a doenças (KHOUDI, 2023). O pvu-MIR-482 também teve como alvo predito uma subunidade do exocisto, complexo proteico envolvido no tráfego de vesículas, e que responde a estresse biótico (PEČENKOVÁ *et al.*, 2020). Por último, o pvu-MIR-482 também teve como alvo predito, dois transcritos da proteína ASA2, que tem um papel protetor no estresse oxidativo (LI *et al.*, 2015).

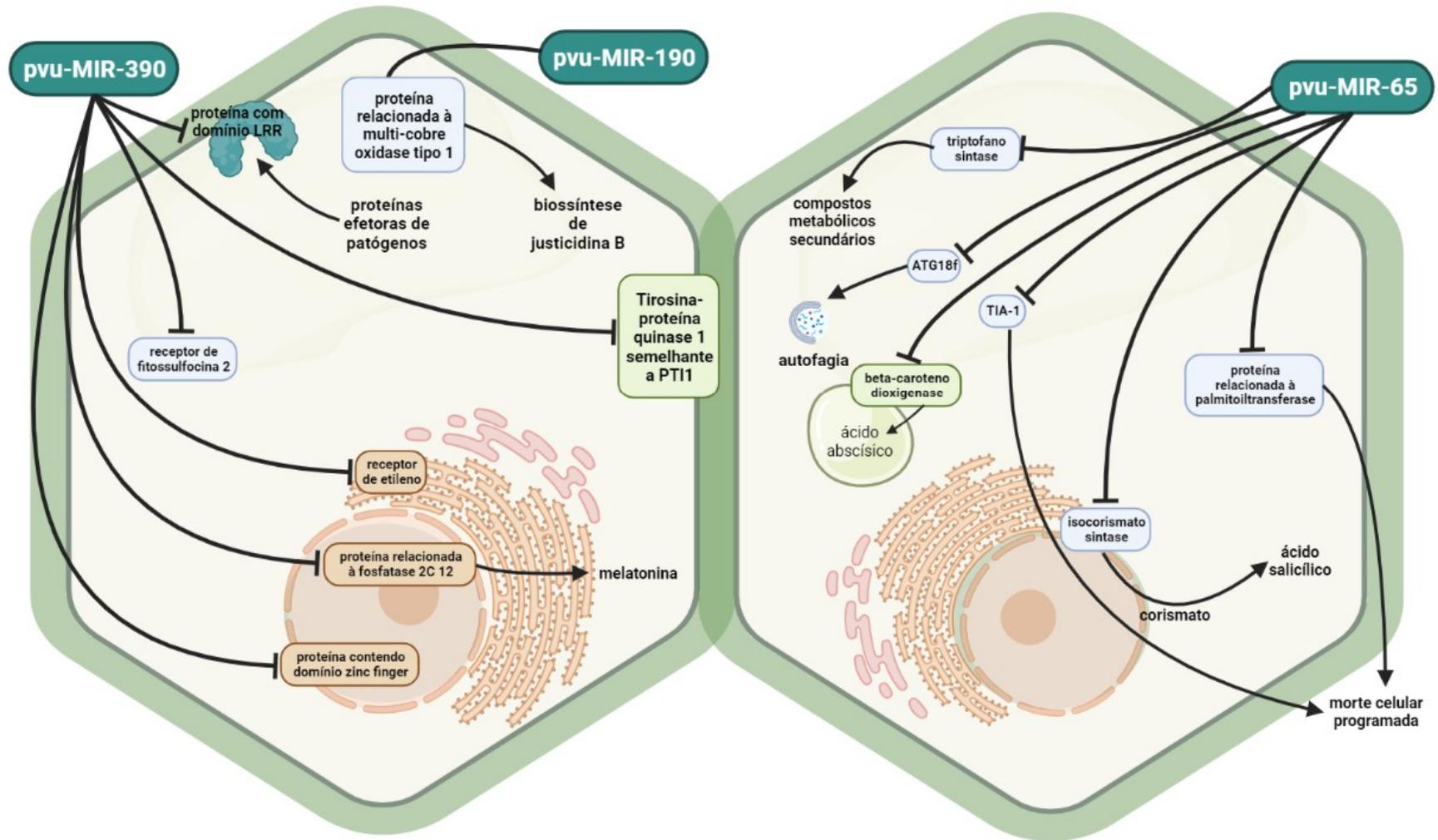
O pvu-MIR-2111 teve três alvos preditos relacionados à resposta da planta contra patógenos. Dois transcritos para a proteína de resistência RPM1, que reconhece proteínas efetoras do patógeno e provoca a resposta de hipersensibilidade (ZHAO *et al.*, 2021a). O miRNA ainda tem como alvo uma proteína com domínio LRR.

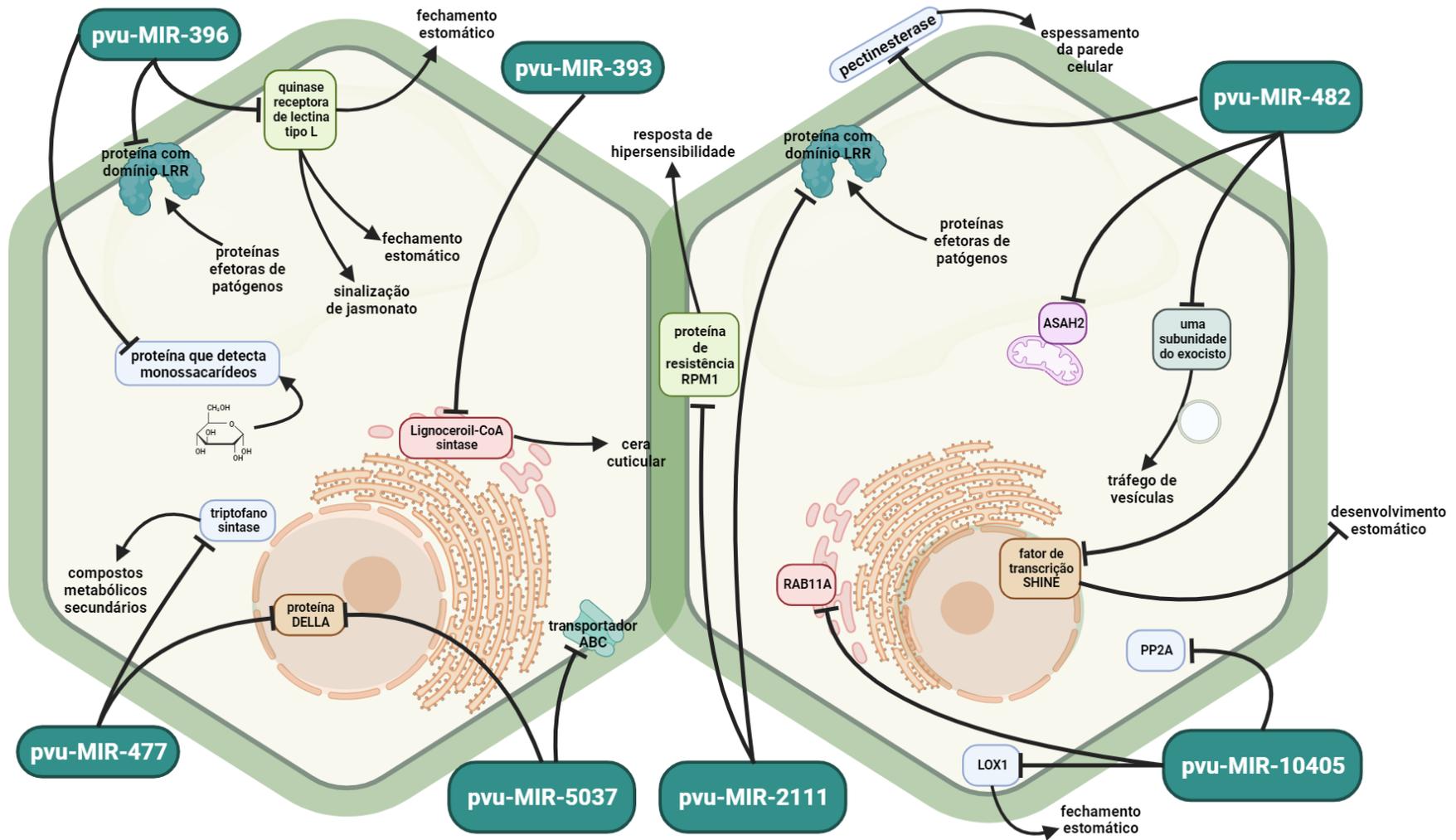
Para o pvu-MIR-5037 foi predito somente um transportador ABC, envolvido no transporte de proteínas efetoras do patógeno, no transporte de ácido abscísico, fechamento estomático, deposição de lipídios e formação da cutícula (DAHUJA *et al.*, 2021); e uma proteína DELLA, assim como o pvu-MIR-477.

O pvu-MIR-10405 foi predito tendo como alvo uma Proteína fosfatase 2A (PP2A), que responde a patógenos, aumentando a resistência da planta (HEIDARI; NEMIE-FEYISSA; LILLO, 2023). O miRNA também teve como alvo predito a proteína Lipoxigenase 1 (LOX1), que é regulada positivamente pelo patógeno, e responde com fechamento estomático (KANG *et al.*, 2021). Por último, foi predito como alvo para o pvu-MIR-10405 a Proteína relacionada a Ras 11 A (RAB11A), proteína associada à endocitose e que já foi vista super expressa em resposta à infecção viral (SOOD; CHAUHAN, 2017).

Não foi previsto nenhum alvo relacionado a resposta imune para os miRNAs: pvu-MIR-61; pvu-MIR-159; pvu-MIR-168; pvu-MIR-1512 e pvu-MIR-4416.

Figura 4 – Vias de atuação dos novos miRNAs identificados em *P. vulgaris* e seus respectivos alvos envolvidos na resposta imune da planta.





Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Setas pontiagudas indicam ativação; setas cegas indicam repressão ou inibição. Figura criada com BioRender.com.

## 5 CONCLUSÃO

Este estudo mostra que uma abordagem *in silico* pode auxiliar na caracterização de novos miRNAs e seus respectivos alvos envolvidos na resposta de defesa de *P. vulgaris* a patógenos. Dada a significativa importância dessa cultura, a identificação desses miRNAs pode contribuir com pesquisas futuras que os utilizem como ferramentas para melhorar a resistência e a produtividade do feijão durante estresses bióticos.

Como perspectivas deste trabalho, propõe-se a validação experimental dos novos miRNAs caracterizados no presente estudo por meio de RT-qPCR. Pretende-se investigar a expressão desses miRNAs no contexto do relevante estresse biótico que afeta a cultura do feijão, provocado pelo fungo *Colletorichum lindemuthianum*. Adicionalmente, esses miRNAs serão depositados no banco de dados PmiREN.

## REFERÊNCIAS

- AXTELL, M. J. Classification and comparison of small RNAs from plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 137–159, 2013.
- AXTELL, M. J.; MEYERS, B. C. Revisiting Criteria for Plant MicroRNA Annotation in the Era of Big Data. **The Plant Cell**, v. 30, n. 2, p. 272–284, 1 fev. 2018.
- BAO, D. et al. Down-regulation of genes coding for core RNAi components and disease resistance proteins via corresponding microRNAs might be correlated with successful Soybean mosaic virus infection in soybean. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, n. 4, p. 948–960, 2018.
- BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C. DE O. Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012.
- BOLOGNA, N. G. et al. Nucleo-cytosolic Shuttling of ARGONAUTE1 Prompts a Revised Model of the Plant MicroRNA Pathway. **Molecular Cell**, v. 69, n. 4, p. 709–719.e5, fev. 2018.
- BROWN, J. K. M. Durable Resistance of Crops to Disease: A Darwinian Perspective. **Annual Review of Phytopathology**, v. 53, n. 1, p. 513–539, 2015.
- CAPLAN, J.; PADMANABHAN, M.; DINESH-KUMAR, S. P. Plant NB-LRR immune receptors: from recognition to transcriptional reprogramming. **Cell Host & Microbe**, v. 3, n. 3, p. 126–135, 13 mar. 2008.
- CORRÊA, M. DE P. Análise de microRNAs em *Arachis duranensis* em resposta a condições de déficit hídrico e infecção por *Meloidogyne arenaria*. 30 mar. 2023.
- DAHUJA, A. et al. Role of ATP-binding cassette transporters in maintaining plant homeostasis under abiotic and biotic stresses. **Physiologia Plantarum**, v. 171, n. 4, p. 785–801, 2021.
- DE SOUSA CARDOSO, T. C. et al. Genome-wide identification and in silico characterisation of microRNAs, their targets and processing pathway genes in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Biology**, v. 18, n. 2, p. 206–219, 2016.
- FÖRCH, P.; VALCÁRCEL, J. Molecular mechanisms of gene expression regulation by the apoptosis-promoting protein TIA-1. **Apoptosis**, v. 6, n. 6, p. 463–468, 1 dez. 2001.
- GAO, Z.; NIE, J.; WANG, H. MicroRNA biogenesis in plant. **Plant Growth Regulation**, v. 93, n. 1, p. 1–12, jan. 2021.
- GERTSCH, J. et al. Antifungal, antiprotozoal, cytotoxic and piscicidal properties of Justicidin B and a new aryl-naphthalide lignan from *Phyllanthus piscatorum*. **Planta Medica**, v. 69, n. 5, p. 420–424, maio 2003.
- GUO, N. et al. Genome-Wide Identification of *Phytophthora sojae*-Associated microRNAs and Network in a Resistant and a Susceptible Soybean Germplasm. **Agronomy**, v. 12, n. 12, p. 2922, dez. 2022.

GUPTA, S. K. et al. Comparative Analysis of Zinc Finger Proteins Involved in Plant Disease Resistance. **PLOS ONE**, v. 7, n. 8, p. e42578, 15 ago. 2012.

HEIDARI, B.; NEMIE-FEYISSA, D.; LILLO, C. Distinct Clades of Protein Phosphatase 2A Regulatory B'/B56 Subunits Engage in Different Physiological Processes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 15, p. 12255, jan. 2023.

KANG, Y. et al. Evolution and functional diversity of lipoxygenase (LOX) genes in allotetraploid rapeseed (*Brassica napus* L.). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 188, p. 844–854, 1 out. 2021.

KHOUDI, H. SHINE clade of ERF transcription factors: A significant player in abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 195, p. 77–88, 1 fev. 2023.

KLOTH, K. J. et al. PECTIN ACETYLESTERASE9 Affects the Transcriptome and Metabolome and Delays Aphid Feeding1 [OPEN]. **Plant Physiology**, v. 181, n. 4, p. 1704–1720, 1 dez. 2019.

KOHLI, D. et al. Identification and Characterization of Wilt and Salt Stress-Responsive MicroRNAs in Chickpea through High-Throughput Sequencing. **PLOS ONE**, v. 9, n. 10, p. e108851, 8 out. 2014.

KULCHESKI, F. R.; MARGIS, R. Pequenos RNAs e aplicações de RNAi em plantas. Em: RESENDE, R. R. (Ed.). **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4**. 1. ed. [s.l.] Editora Blucher, 2017. p. 675–708.

KUO, Y.-W.; FALK, B. W. RNA interference approaches for plant disease control. **BioTechniques**, v. 69, n. 6, p. 469–477, dez. 2020.

LEARY, A. Y. et al. Contrasting and emerging roles of autophagy in plant immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, Cell biology. v. 52, p. 46–53, 1 dez. 2019.

LEWANDOWSKA, M.; KEYL, A.; FEUSSNER, I. Wax biosynthesis in response to danger: its regulation upon abiotic and biotic stress. **New Phytologist**, v. 227, n. 3, p. 698–713, 2020.

LI, J. et al. An Arabidopsis neutral ceramidase mutant *ncer1* accumulates hydroxyceramides and is sensitive to oxidative stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 2015.

LI, Y. et al. Genome-wide analysis of key gene families in RNA silencing and their responses to biotic and drought stresses in adzuki bean. **BMC Genomics**, v. 24, n. 1, p. 195, 12 abr. 2023.

LIU, S. et al. Identification of candidate chromosome region of *Sbwm1* for Soil-borne wheat mosaic virus resistance in wheat. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 8119, 15 maio 2020.

LIU, W. et al. Characterization and Function of MicroRNA\*s in Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2017.

MACWILLIAMS, J. R. et al. Transcriptome analysis of aphid-resistant and susceptible near isogenic lines reveals candidate resistance genes in cowpea (*Vigna unguiculata*). **BMC Plant Biology**, v. 23, n. 1, p. 22, 11 jan. 2023.

MALHOTRA, E. V. et al. Comparative analysis of herbivory responsive miRNAs to delineate pod borer (*Helicoverpa armigera*) resistance mechanisms in *Cajanus cajan* and its wild relative *Cajanus scarabaeoides*. **Plant Cell Reports**, v. 41, n. 4, p. 1147–1161, 1 abr. 2022.

MATHUR, M.; NAIR, A.; KADDOO, N. Plant-pathogen interactions: MicroRNA-mediated trans-kingdom gene regulation in fungi and their host plants. **Genomics**, v. 112, n. 5, p. 3021–3035, 1 set. 2020.

MEHANATHAN, M. et al. Identification of candidate resistance genes of cotton against *Aspergillus flavus* infection using a comparative transcriptomics approach. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 24, n. 3, p. 513–519, 1 maio 2018.

NAIR, M. M.; MANICKAVELU, A. MicroRNAs as Fine-Tuners of Gene Regulation in Plant–Microbe Interactions. **Current Science**, v. 119, n. 8, p. 1282, 25 out. 2020.

NATALINI, A.; PALMA, D. Chapter 15 - Ethylene and biotic stress in crops. Em: KHAN, N. A.; FERRANTE, A.; MUNNÉ-BOSCH, S. (Eds.). **The Plant Hormone Ethylene**. [s.l.] Academic Press, 2023. p. 221–232.

NETO, A. A. DE O.; SANTOS, C. M. R. **A cultura do feijão**. Brasília: Conab, 2018.

PASARI, N. et al. Genome-Wide Identification of SWEET Genes in *Cicer arietinum* and Modulation of Its Expression in Endophytic Interactions with *Serendipita indica*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 42, n. 9, p. 5855–5868, 1 set. 2023.

PATWA, N. et al. Identification and characterization of differentially expressed *Phaseolus vulgaris* miRNAs and their targets during mungbean yellow mosaic India virus infection reveals new insight into *Phaseolus*-MYMIV interaction. **Genomics**, v. 111, n. 6, p. 1333–1342, 1 dez. 2019.

PEČENKOVÁ, T. et al. Redundant and Diversified Roles Among Selected *Arabidopsis thaliana* EXO70 Paralogs During Biotic Stress Responses. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 2020.

PRABHUKARTHIKEYAN, S. R. et al. Bio-suppression of turmeric rhizome rot disease and understanding the molecular basis of tripartite interaction among *Curcuma longa*, *Pythium aphanidermatum* and *Pseudomonas fluorescens*. **Biological Control**, v. 111, p. 23–31, 1 ago. 2017.

PU, M. et al. Regulatory network of miRNA on its target: coordination between transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 3, p. 441–451, 1 fev. 2019.

RAMESH, S. V. et al. Expression dynamics of *Glycine max* (L.) Merrill microRNAs (miRNAs) and their targets during Mungbean yellow mosaic India virus (MYMIV) infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 100, p. 13–22, 1 dez. 2017.

- SAUCEDO-GARCÍA, M. et al. MPK6, sphinganine and the LCB2a gene from serine palmitoyltransferase are required in the signaling pathway that mediates cell death induced by long chain bases in Arabidopsis. **New Phytologist**, v. 191, n. 4, p. 943–957, 2011.
- SONG, X. et al. MicroRNAs and Their Regulatory Roles in Plant–Environment Interactions. **Annual Review of Plant Biology**, v. 70, n. 1, p. 489–525, 2019.
- SOOD, A.; CHAUHAN, R. S. Comparative NGS Transcriptomics Unravels Molecular Components Associated with Mosaic Virus Infection in a Bioenergy Plant Species, *Jatropha curcas* L. **BioEnergy Research**, v. 10, n. 1, p. 129–145, 1 mar. 2017.
- THAKUR, V. et al. Characterization of statistical features for plant microRNA prediction. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 108, 16 fev. 2011.
- TYAGI, S. et al. Plant microRNAs: biogenesis, gene silencing, web-based analysis tools and their use as molecular markers. **3 Biotech**, v. 9, n. 11, p. 413, 23 out. 2019.
- VERMA, V.; RAVINDRAN, P.; KUMAR, P. P. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. **BMC Plant Biology**, v. 16, n. 1, p. 86, 14 abr. 2016.
- WANG, M. et al. Small RNA profiling reveal regulation of microRNAs in field peanut pod rot pathogen infection. **Biologia**, v. 75, n. 10, p. 1779–1788, 1 out. 2020.
- WANG, Y.; BOUWMEESTER, K. L-type lectin receptor kinases: New forces in plant immunity. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 8, p. e1006433, 17 ago. 2017.
- WEI, H. et al. Comprehensive Analysis of Carotenoid Cleavage Dioxygenases Gene Family and Its Expression in Response to Abiotic Stress in Poplar. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1418, jan. 2022.
- WILDERMUTH, M. C. et al. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. **Nature**, v. 414, n. 6863, p. 562–565, nov. 2001.
- WILLOCQUET, L.; SAVARY, S.; YUEN, J. Multiscale Phenotyping and Decision Strategies in Breeding for Resistance. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 5, p. 420–432, 1 maio 2017.
- XIE, D. et al. Phase separation of SERRATE drives dicing body assembly and promotes miRNA processing in Arabidopsis. **Nature Cell Biology**, v. 23, n. 1, p. 32–39, jan. 2021.
- XU, L. et al. An expression atlas of miRNAs in Arabidopsis thaliana. **Science China Life Sciences**, v. 61, n. 2, p. 178–189, 1 fev. 2018.
- XU, Y. et al. Multiple MicroRNAs are Involved in Regulating Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Resistance to *Sclerotium rolfsii* at the Early Stage. **Tropical Plant Biology**, v. 15, n. 4, p. 276–287, 1 dez. 2022.
- XU, Y.; CHEN, X. microRNA biogenesis and stabilization in plants. **Fundamental Research**, v. 3, n. 5, p. 707–717, set. 2023.

ZHAO, C. et al. Integrated small RNA and mRNA expression profiles reveal miRNAs and their target genes in response to *Aspergillus flavus* growth in peanut seeds. **BMC Plant Biology**, v. 20, n. 1, p. 215, 13 maio 2020.

ZHAO, G. et al. Functions of RPM1-interacting protein 4 in plant immunity. **Planta**, v. 253, n. 1, p. 11, 3 jan. 2021a.

ZHAO, H. et al. Histone deacetylase 9 regulates disease resistance through fine-tuning histone deacetylation of melatonin biosynthetic genes and melatonin accumulation in cassava. **Journal of Pineal Research**, v. 74, n. 3, p. e12861, 2023.

ZHAO, M. et al. Coordination of MicroRNAs, PhasiRNAs, and NB-LRR Genes in Response to a Plant Pathogen: Insights from Analyses of a Set of Soybean Rps Gene Near-Isogenic Lines. **The Plant Genome**, v. 8, n. 1, p. plantgenome2014.09.0044, 2015.

ZHAO, Y. et al. MicroRNA annotation in plants: current status and challenges. **Briefings in Bioinformatics**, v. 22, n. 5, p. bbab075, 1 set. 2021b.

## APÊNDICE A

pvu-MIR-61

Sequência madura: GAUAAUUGGUGCGGUUCAAU

Sequência do precursor:

GAUAAUUGGUGCGGUUCAAUCAAGGCAGUGUUUUGUUAUCCAAAACUCUGUGUUGUUUGAU  
UGAGCCGUGCCAAUAUCAC

Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa UNAFold:

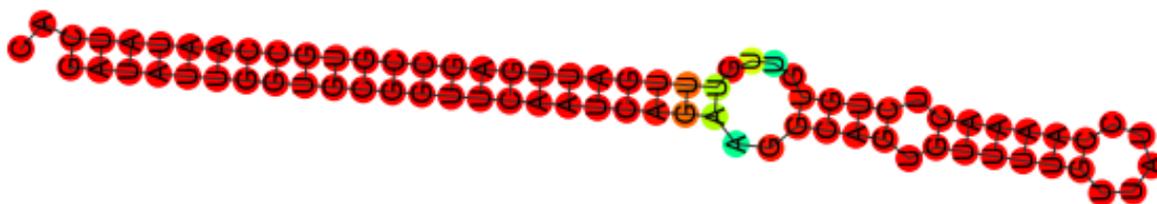
dG = -40.70 dH = -284.90 dS = -787.36 Tm = 88.7 °C

```

--          10          20          30          UU          UU
      GAUAAUUGGUGCGGUUCAAUCAAGGCAGUGUUUUGUUAUCCAAAACUCUGUGUUGUUUGAU
      CUAUAACCGUGCCGAGUUAGUUU      UGUC CAAAAC  A
CA
80          70          60          50          40
      GUUG^      U      CU

```

Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa RNAFold:



Legenda: Os nucleotídeos com a cor vermelha significam 100% probabilidade de pareamento, a cor azul significa 0 probabilidade de pareamento, e as demais cores significam probabilidades intermediárias.

pvu-MIR-65

Sequência madura: GGAGGCAGCGGUUCAUCGAUC

Sequência do precursor:

GGAGGCAGCGGUUCAUCGAUCUCUCUCCUGAAUUUGGCUGUGGAAGAACACAAAACAAGAAUC  
GGUCGAUAAACCUCUGCAUCCAG

Estruturas secundárias do precursor gerada pelo programa UNAFold:

dG = -26.70 dH = -244.60 dS = -702.56 T<sub>m</sub> = 75.0 °C

```

      10      20      30      40
--  G    C    C    UCUCUUC|  A-    GC-    GA
    GGA GCAG GGUU AUCGA      CUGA  UUUG  UGUG  A
    CCU CGUC CCAA UAGCU      GGCU  GAAC  ACAC  G
GA   A    U    A    -----^  AA    AAA    AA
      80      70      60      50

```

Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa RNAFold:



pvu-MIR-159

Sequência madura: AGCUGCUUAGCUAUGGAUCCC

Sequência do precursor:

AGCUGCUUAGCUAUGGAUCCCACAGUUCUACCCAUCAGCAUGUUUUGUGGUAGUCUUGUGGC  
 UUCCAUAUCUGGGGAGCUUC

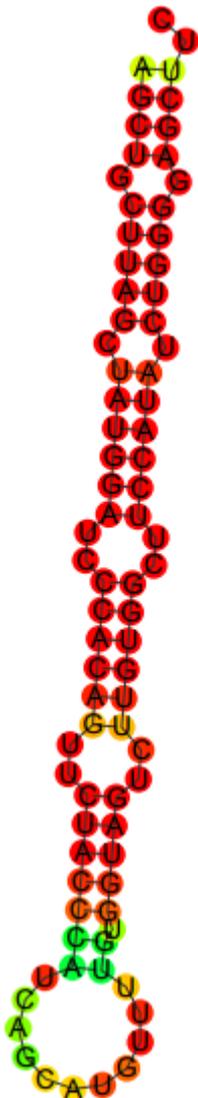
Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa UNAFold:

dG = -31.20 dH = -252.00 dS = -711.91 Tm = 80.8 °C

```

      10      20      30
--   G      C      UC      UU      -  U--| G
    AGCU CUUAG UAUGGA CCACAG CUACC CA  CA \
    UCGA GGGUC AUACCU GGUGUU GAUGG GU  GU C
CU    G      U      UC      CU      U  UUU^ A
    80      70      60      50      40
  
```

Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa RNAFold:



pvu-MIR-168

Sequência madura: CCCGCCUUGCAUCAACUGAAU

Sequência do precursor:

UCGCUUGGUGCAGGUCGGGAACCGUUUUUGCGCGAAAUGGUGGAGUGGUUGCCGGCGGCCGA  
AUUGGAUCCCGCCUUGCAUCAACUGAAU

Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa UNAFold:

dG = -39.20 dH = -261.70 dS = -717.39 Tm = 91.6 °C

```

      10          20          30          40
--|  C          U      A  UGUU      G  AAA      AG
   UCG UUGGUGCAGG CGGGA CC      UUUGC CG      UGGUGG \
   AGU AACUACGUUC GCCCU GG      AAGCG GC      GCCGUU U
UA^  C          C      A  UU--      -  G--      GG
.      80          70          60          50

```

Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa RNAFold:



pvu-MIR-190

Sequência madura: AGGUAUUGGCGCGCCUCAAUU

Sequência do precursor:  
 AGGUAUUGGCGCGCCUCAAUUUGAAGACAUGGUUAAACAGGAAAACCAACCAUGUGGUUUUAA  
 UUGAGCCGCGUCAUAUCUCA

Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa UNAFold:

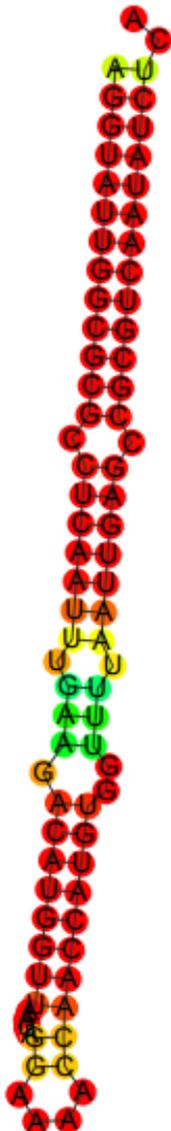
dG = -33.30 dH = -239.70 dS = -665.48 Tm = 87.0 °C

```

      10      20      30      40
--          C      U-| AG      AACAG
  AGGUAUUGGCGCG CUCAAUU GA  ACAUGGUU  G
  UCUAUAACUGCGC GAGUUAA UU  UGUACCAA  A
AC          C      UU^ GG      CCAAA
  80      70      60      50

```

Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa RNAFold:



pvu-MIR-390

Sequência madura: AAGCUCAGGAGGGGAUAGCGCC

Sequência do precursor:  
 AAGCUCAGGAGGGGAUAGCGCCAUGAUUCUCACAUCAUAGUGUUCUUUGGCGCUAUCUAUCCU  
 GAGUUUCA

Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa UNAFold:

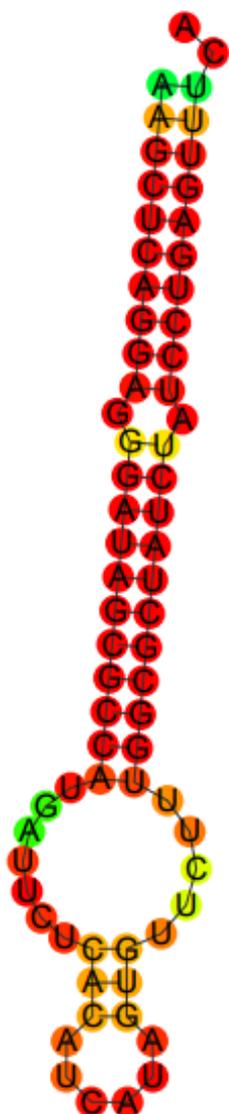
dG = -37.20 dH = -256.80 dS = -708.04 Tm = 89.5 °C

```

      10      20      30
--      G      U-| UUCU  AU
  AAGCUCAGGA GGAUAGCGCCA GA  CAC  C
  UUUGAGUCCU UCUAUCGCGGU  CU  GUG  A
AC          A          UU^ U---  AU
.          60          50          40

```

Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa RNAFold:



pvu-MIR-393a

Sequência madura: AUCAUGCUAUCCCUUUGGAUU

Sequência do precursor:

UCCAAAGGGGAUCGCAUUGAUCCCAAUUCUCAGAUUUUAUAAAUUUUUCCUUCUUCUUUUUCU  
UAAUAUUUGGGAUCAUGCUAUCCCUUUGGAUU

Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa UNAFold:

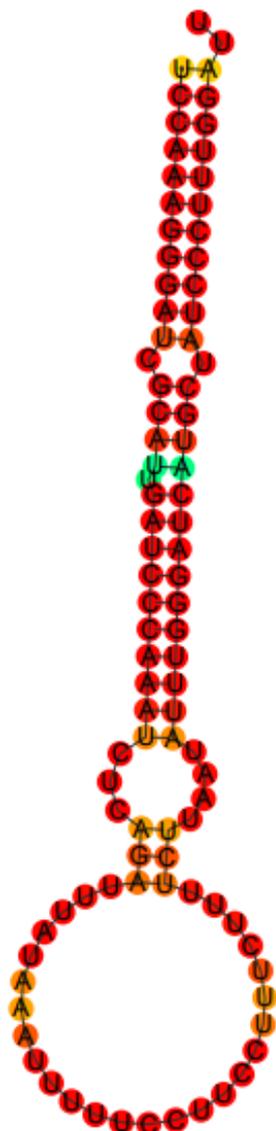
dG = -33.40 dH = -256.90 dS = -720.62 Tm = 83.3 °C

```

      10      20      30      40
--|          C    U          CUC-  UUUUAUAAAUUUU
UCCAAAGGGAU GCAU GAUCCCAAU   AGA          U
AGGUUUCCCUA CGUA CUAGGGUUUA   UCU          C
UU^          U    -          UAAU   UUUCUUUCCUUC
      90      80      70      60      50

```

Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa RNAFold:



pvu-MIR-393b

Sequência madura: AUCAUGCUAUCCCUUUGGAU

Sequência do precursor:

CCAAAGGGAUCGCAUUGAUCCAAAUCCAACCUCUCAUAUUCUCUCUCCACUCACAGUAU  
UUGGGAUCAUGCUAUCCCUUUGGAU

Estruturas secundárias do precursor gerada pelo programa UNAFold:

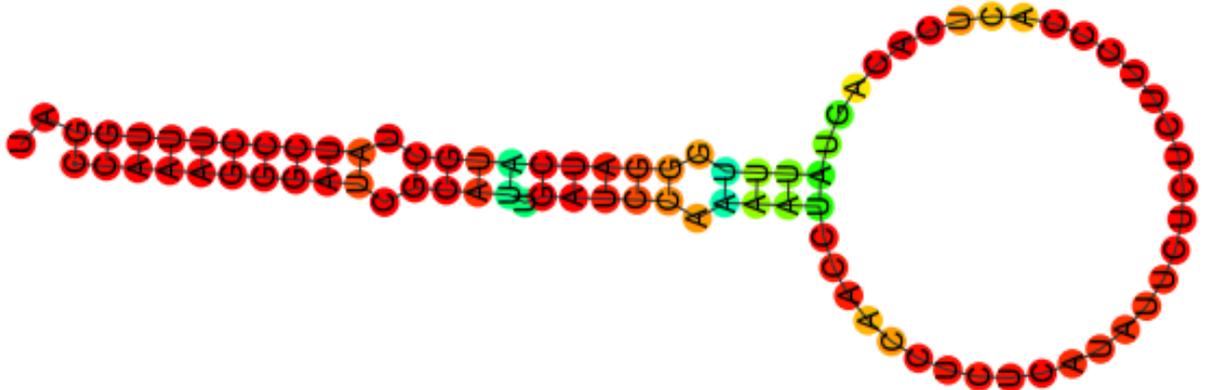
dG = -25.66 dH = -200.40 dS = -563.40 Tm = 82.5 °C

```

      10      20      30      40
--|      C    U    A    CCAACCUCUCAUAUUC
  CCAAAGGGAU GCAU GAUCC AAU      U
  GGUUUCCCUA CGUA CUAGG UUUA      C
UA^      U    -    G    UGACACUCACCCUUCU
      80      70      60      50

```

Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa RNAFold:



pvu-MIR-396a

Sequência madura: AAGAAAGCUGUGGGAGAAUAUGGC

Sequência do precursor:

CAUGC UUUUCCACAGCUUUCUUGAACUUCUUCUGCAUCUUAUAUCUCUCCGCCUCCAGGAUU  
 UUAAGCCCUAGAAGCUCAAGAAAGCUGUGGGAGAAUAUGGC

Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa UNAFold:

dG = -39.20 dH = -283.90 dS = -788.97 T<sub>m</sub> = 86.7

°C

```

--|      C          10          20          30          40          50
      CAUG UUUUCCACAGCUUUCUUGA CUUCU          CUUA  AUCU  \
      GUAU AGAGGGUGUCGAAAGAACU GAAGA          GAAU  UAGG  C
CG^      A          C          UCCC---      UU  ACCUC
100      90          80          70          60

```

Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa RNAFold:



pvu-MIR-396b

Sequência madura: AAGCUCAAGAAAGCUGUGGGA

Sequência do precursor:

CCACAGCUUUCUUGAACUUCUUCUGCAUCUUAUAUCUCUCCGCCUCCAGGAUUUUUAAGCCCU  
AGAAGCUCAAGAAAGCUGUGGGA

Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa UNAFold:

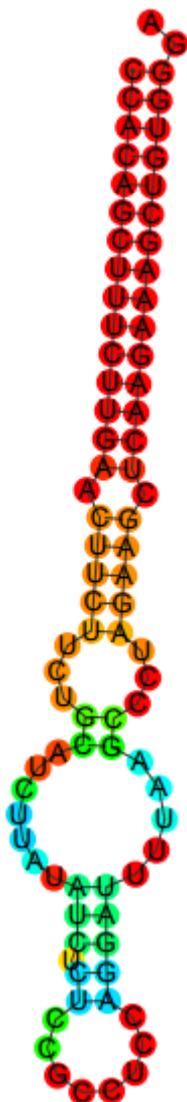
dG = -32.40 dH = -247.60 dS = -693.86 Tm = 83.7 °C

```

      10      20      30      40
--|          A      UCUGCAU      U-      CUCCG
  CCACAGCUUUCUUGA CUUCU      CUUA  AUCU      \
  GGUGUCGAAAGAACU GAAGA      GAAU  UAGG      C
AG^          C      UCCC---      UU      ACCUC
      80      70      60      50

```

Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa RNAFold:



pvu-MIR-396c

Sequência madura: UCCACAGCUUUCUUGAAC

Sequência do precursor:

UCCACAGCUUUCUUGAACUUCUUCUGCAUCUUAUAUCUCUCCGCCUCCAGGAUUUUAAAGCCC  
UAGAAGCUCAAGAAAGCUGUGGGAG

Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa UNAFold:

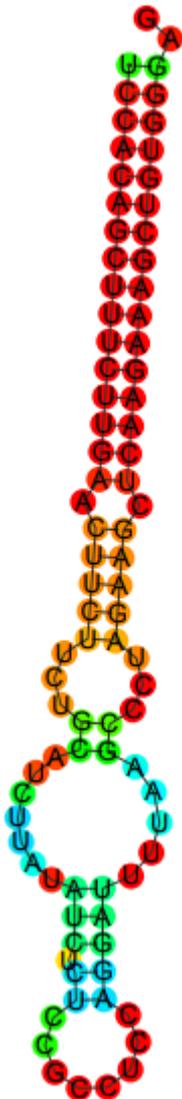
dG = -33.30 dH = -251.40 dS = -703.21 Tm = 84.4 °C

```

      10      20      30      40
--|          A    UCUGCAU    U-    CUCCG
  UCCACAGCUUUCUUGA CUUCU      CUUA  AUCU  \
  GGGUGUCGAAAGAACU GAAGA      GAAU  UAGG  C
GA^          C    UCCC---    UU    ACCUC
      80      70      60      50

```

Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa RNAFold:



pvu-MIR-477

Sequência madura: UCCCUCAAAGGCUUCCAGUA

Sequência do precursor:

UCCCUCAAAGGCUUCCAGUAUUCAGUAAGCUAAGUUACUUGAAUGCUGGAAGUUUUUGAAGG  
AAU

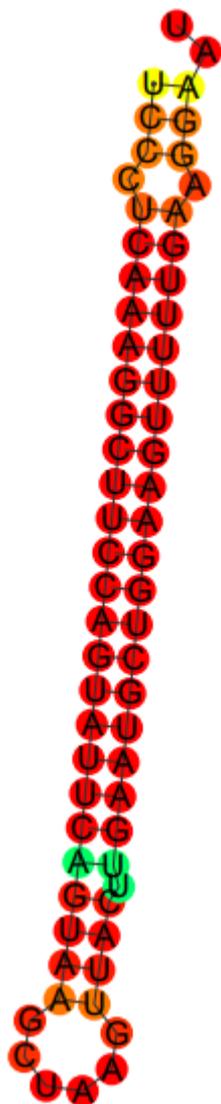
Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa UNAFold:

dG = -32.40 dH = -231.30 dS = -641.30 Tm = 87.5 °C

```

      10          20          30
--  C          -|      GC
    UCC UCAAAGGCUUCCAGUAUUC AGUAA  U
    AGG AGUUUUUGAAGGUCGUAAG UCAUU  A
UA   A          U^      GA
      60          50          40

```



pvu-MIR-482

Sequência madura: AGAAUUUGUGGGAAUGGGCUGA

Sequência do precursor:

AGAAUUUGUGGGAAUGGGCUGAUUGGGAAAGCAAUGAAAACUCAAGCAAUUGUGUCUACAUUU  
UCUUCCCAAUUCGCCCAUCCAUUGAUUUUCUGA

Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa UNAFold:

dG = -40.40 dH = -312.60 dS = -877.64 Tm = 83.0 °C

```

--      U      10      20      30      40
      AGAA UUGUGGGAAUGGGC GAUUGGGAAG AAUG AC CAA C
      UCUU AGUAUCCUACCCG UUAACCCUUC UUAC UG GUU A
AG      U      CC      UU^ AUC U A
      90      80      70      60      50

```

Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa RNAFold:



pvu-MIR-1512

Sequência madura: GCUUUAAGAAUUUCAGUUAUG

Sequência do precursor:

UAACUGAAUAUUCUAAAAGCCUUACCAUUGUUAAGGCAACAUCAUUGUGAUGUGAAAAAUGG  
GAAUGC UUUAAGAAUUUCAGUUAUG

Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa UNAFold:

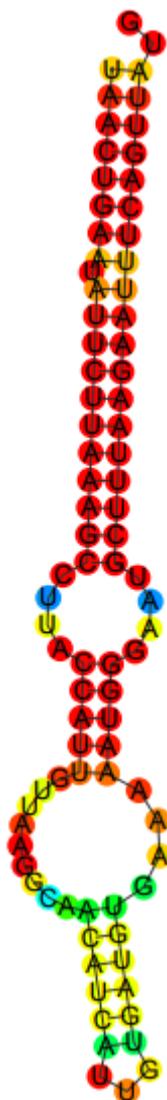
dG = -30.80 dH = -265.80 dS = -757.70 Tm = 77.6 °C

```

      10      20      30      40
--|      U      C A      G AAGGCA      U
UAACUGAA AUUCUAAAAGC UU CCAUU UU      ACAUCA \
AUUGACUU UAAGAAUUUCG AA GGUAA AA      UGUAGU U
GU^      -      U G      A G-----      G
      80      70      60      50

```

Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa RNAFold:



pvu-MIR-2111

Sequência madura: GUCCUUGGGAUGCAGAUUA

Sequência do precursor:

AUCUGCAUCCUGAGGUUUAGAACAAUAUUUUUAUUGUGUCUAGUCCUUGGGAUGCAGAUUA

Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa UNAFold:

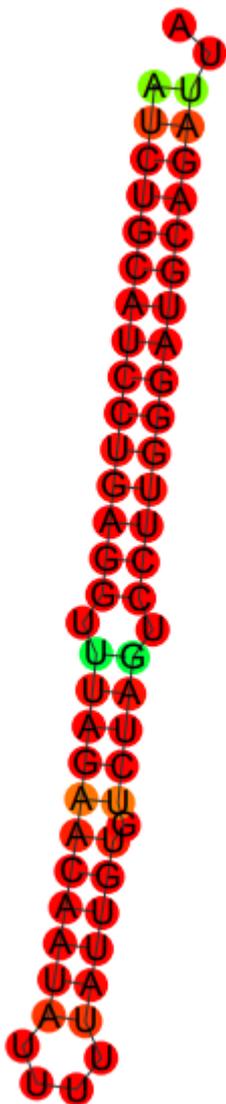
dG = -30.40 dH = -220.20 dS = -611.96 Tm = 86.7 °C

```

--          10          20
          U          -|          U
AUCUGCAUCCUGAGG UUAGA ACAAUA U
UAGACGUAGGGUCC GAUCU UGUUAU U
AU          U          G^          U
60          50          40          30

```

Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa RNAFold:



pvu-MIR-4416

Sequência madura: ACGGGUCGCUCUCACCUAG

Sequência do precursor:

GGGUGAGAGAUACGCGUAUCCAAUGCUUAGAUACGGGUCGCUCUCACCUAG

Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa UNAFold:

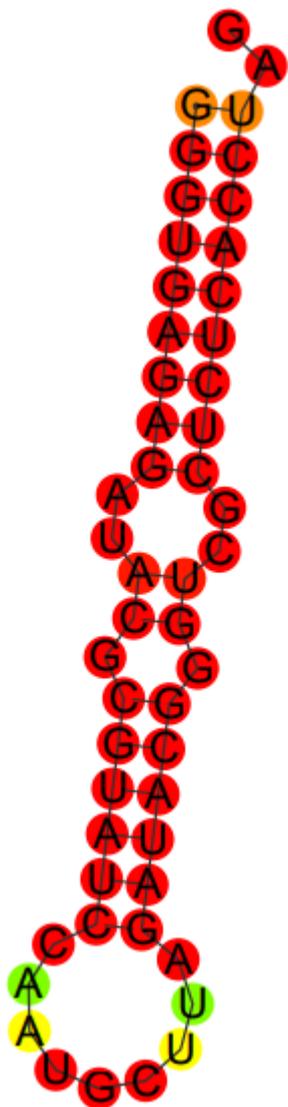
dG = -22.40 dH = -164.30 dS = -457.52 Tm = 86.0 °C

```

      10      20
--|      AU G      C U
   GGGUGAGAG AC CGUAUC AA \
   UCCACUCUC  UG GCAUAG UU G
GA^          GC G      A C
50          40      30

```

Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa RNAFold:



pvu-MIR-5037a

Sequência madura: CCUCAAAGGCUUCCACUACUG

Sequência do precursor:  
 CCUCAAAGGCUUCCACUACUGCAUCUUUCUGUCGGUUUAAUAUCCUGAAACAAGUAGUAGUG  
 GAGGCUUGAAAGGUC

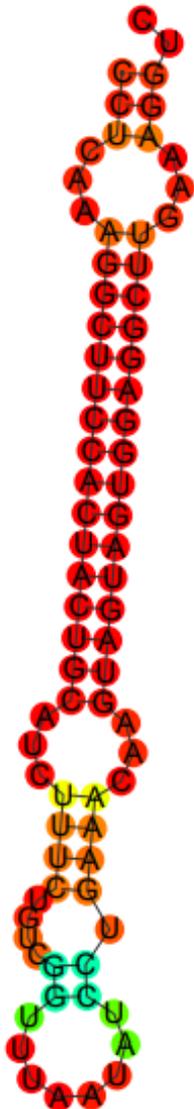
Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa UNAFold:

dG = -26.70 dH = -244.80 dS = -703.21 Tm = 75.0 °C

```

      10          20          30
--|  CAA                AUC    UGUC  UUU
    CCU  AGGCUUCCACUACUGC  UUUC    GG  A
      GGA  UUCGGAGGUGAUGAUG  AAAG    CC  A
CU^  AAG                AAC    U---  UAU
      70          60          50          40
  
```

Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa RNAFold:



pvu-MIR-5037b

Sequência madura: CCUCAAAGGCUUCCACUACU

Sequência do precursor:

CCUCAAAGGCUUCCACUACUCUAUAUUUCAGUCAUCAAAUAUGGAGUAUGGAGGAGUGGACU  
UUUGAGGCC

Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa UNAFold:

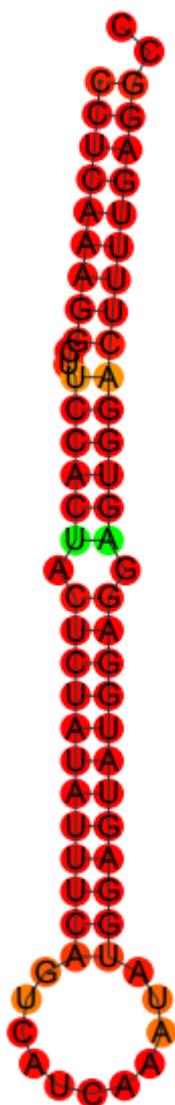
dG = -30.80 dH = -211.50 dS = -582.62 Tm = 89.9 °C

```

          10          20          30
--|          CU          A          GUCAU
  CCUCAAAGG  UCCACU  CUCUAUAUUUCA  \
    GGAGUUUUC  AGGUGA  GAGGUAUGAGGU  C
CC^          --          G          AUAAA
70          60          50          40

```

Estrutura secundária do precursor gerada pelo programa RNAFold:





## APÊNDICE B

miRNA	Locus	Valor esperado	Descrição do alvo	Alinhamento miRNA-alvo	Tipo de inibição
pvu-MIR-61	Phvul.002G031400	2.5	PF04564//PF05804 - U-box domain (U-box) // Kinesin-associated protein (KAP) (KAP)	5' AUUGAACCGCACCAUAUC 3'           :         -       - 3' AAACUUGGUGUGGUUUUAG 5'	Clivagem
pvu-MIR-61	Phvul.008G165200	3.0	PTHR31636:SF25 - SCARECROW-LIKE PROTEIN 26	5' AUUGAACCGCACCAUAUC 3'         -       -                 3' UAACUCGGCUUGGUUAUAG 5'	Repressão traducional
pvu-MIR-61	Phvul.002G027500	3.0	PTHR31636:SF53 - SCARECROW-LIKE PROTEIN 15	5' AUUGAACCGCACCAUAUC 3'         -       -                 3' UAACUCGGCGAGGUUAUAG 5'	Repressão traducional
pvu-MIR-61	Phvul.010G072700	3.0	PTHR31636:SF11 - SCARECROW-LIKE PROTEIN 22-RELATED	5' AUUGAACCGCACCAUAUC 3'         -       -                 3' UAACUCGGCGCGGUUAUAG 5'	Repressão traducional
pvu-MIR-61	Phvul.010G072900	3.0	PTHR31636:SF11 - SCARECROW-LIKE PROTEIN 22-RELATED	5' AUUGAACCGCACCAUAUC 3'         -       -                 3' UAACUCGGCGCGGUUAUAG 5'	Repressão traducional
pvu-MIR-61	Phvul.008G143400	3.0	PTHR31636:SF11 - SCARECROW-LIKE PROTEIN 22-RELATED	5' AUUGAACCGCACCAUAUC 3'         -       -                 3' UAACUCGGCGCGGUUAUAG 5'	Repressão traducional
pvu-MIR-61	Phvul.004G109500	3.0	PF07714//PF11721 - Protein tyrosine kinase (Pkinase_Tyr) // Diglucose binding within endoplasmic reticulum (Malectin)	5' AUUGAACCGCACCAUAUC 3'               -                 3' UAACUUGG-GUGGUUAUAG 5'	Clivagem
pvu-MIR-65	Phvul.002G112900	3.0	PTHR22883:SF33 - PALMITOYLTRANSFER	5' GGAGGCAGCGGUUCAUCGAUC 3'       :       :       :         -	Clivagem

			ASE ZDHC12-RELATED	3' CCUUCGUUGCAGGUAGCCAA 5'	
pvu-MIR-65	Phvul.005G022900	3.0	K14759 - isochorismate synthase / 2-succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1-carboxylate synthase / 2-succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadiene-1-carboxylate synthase / O-succinylbenzoate synthase (PHYLLO)	5' GGAGGCAGCGGUUCAUCGAUC 3' :      -     :    : -  3' UCUCCGUGGCCAGGUAGUUUG 5'	Clivagem
pvu-MIR-65	Phvul.001G256400	3.0	PTHR10314//PTHR10314:SF70 - SER/THR DEHYDRATASE, TRP SYNTHASE // SUBFAMILY NOT NAMED	5' GGAGGCAGCGGUUCAUCGAUC 3' :     -    : :     -- 3' UCUCUUCGUCAGGUAGCUCA 5'	Clivagem
pvu-MIR-65	Phvul.001G141300	3.0	KOG0148//KOG4205 - Apoptosis-promoting RNA-binding protein TIA-1/TIAR (RRM superfamily) // RNA-binding protein musashi/mRNA cleavage and polyadenylation factor I complex, subunit HRP1	5' GGAGGCAGCGGUUCAUCGAUC 3'         -       - : :- 3' CCUCGUCUCCAAGUAAUUGU 5'	Clivagem
pvu-MIR-65	Phvul.011G140900	3.0	PTHR13268:SF1 - AUTOPHAGY-RELATED PROTEIN 18F	5' GGAGGCAGCGGUUCAUCGAUC 3' :       : :- :   -  3' UCUCGUCGUCGACUGGCUCG 5'	Clivagem

pvu-MIR-65	Phvul.009G109200	3.0	PTHR10543//PTHR10543:SF30 - BETA-CAROTENE DIOXYGENASE // SUBFAMILY NOT NAMED	5' GGAGGCAGCGGUUCAUCGAUC 3'    :       ---  : :- 3' CCUUCGUCGCCAACCAGUUGU 5'	Clivagem
pvu-MIR-159	Phvul.008G166700	3.0	2.7.12.1//2.7.12.2 - Mitogen-activated protein kinase kinase / MKK	5' AGCUGCUUAGCUAUGGAUCCC 3'    -     : - - --- 3' UCGAAGAAUCGGUACCGAGAU 5'	Clivagem
pvu-MIR-159	Phvul.008G137400	3.0	PTHR13604 - DC12-RELATED	5' AGCUGCUUAGCUAUGGAUCCC 3'  :       : - - --- 3' UUGACGAAUCGGUCCAUGUC 5'	Clivagem
pvu-MIR-168	Phvul.003G276100	2.5	K17783 - mitochondrial FAD-linked sulfhydryl oxidase	5' CCCGCCUUGCAUCAACUGAAU 3'    :       ---  3' GGGUGGAACGUAGUUGAGCAA 5'	Clivagem
pvu-MIR-168	Phvul.009G007600	3.0	PF00083//PF07690 - Sugar (and other) transporter (Sugar_tr) // Major Facilitator Superfamily (MFS_1)	5' CCCGCCUUGCAUCAACUGAAU 3'  -       : - - --- 3' GGACGGAACGUGGUUGUCUUU 5'	Clivagem
pvu-MIR-190	Phvul.011G102900	2.0	Proteína não identificada	5' AGGUAAUUGGCGGCCUCAAUU 3'   :     : - - --- 3' UCUAUAACUGCGCCGAGUUA 5'	Clivagem
pvu-MIR-190	Phvul.001G066300	3.0	PF00069//PF07645//PF13947 - Protein kinase domain (Pkinase) // Calcium-binding EGF domain (EGF_CA) // Wall-associated receptor kinase galacturonan-binding (GUB_WAK bind)	5' AGGUAAUUGGCGGCCUCAAUU 3'  :       : - - --- 3' UUCAUAACUGGGUGGAGUUUC 5'	Repressão traducional

pvu-MIR-190	Phvul.001G001500	3.0	PTHR11709:SF90 - MULTI-COPPER OXIDASE TYPE I FAMILY PROTEIN- RELATED	5' AGGUAUUGGCGCGCCUCAAUU 3'                     -       : -     -   3' UCCAUAACCGCACGGGUUUUA 5'	Clivagem
pvu-MIR-390	Phvul.008G252900	2.5	Proteína não identificada	5' AAGCUCAGGAGGGGAUAGCGCC 3'                 :     - :                 3' UUCGAGUUCUAUCUAUCGCGG 5'	Repressão traducional
pvu-MIR-390	Phvul.008G096900	2.5	PTHR27004:SF37 - DISEASE RESISTANCE FAMILY PROTEIN/LRR FAMILY PROTEIN- RELATED	5' AAGCUCAGGAGGGGAUAGCGCC 3'                             - - :   :     3' UUCGAGUCCUCCCUAAAGUGG 5'	Clivagem
pvu-MIR-390	Phvul.009G064200	2.5	PTHR13832:SF25 - PROTEIN PHOSPHATASE 2C 12- RELATED	5' AAGCUCAGGAGGGGAUAGCGCC 3'                 :       :     -     :   - 3' UUCGAGUCUCCUUAACGUGA 5'	Clivagem
pvu-MIR-390	Phvul.006G120500	3.0	Proteína não identificada	5' AAGCUCAGGAGGGGAUAGCGCC 3'                 : - :             :     3' UUCGAGUCUAUCCUAUCGUGG 5'	Repressão traducional
pvu-MIR-390	Phvul.007G004200	3.0	PTHR27001:SF115 - PTI1-LIKE TYROSINE- PROTEIN KINASE 1- RELATED	5' AAGCUCAGGAGGGGAUAGCGCC 3'                 :     :   :   :   :   :     3' UUCGAGUUCUUCUUGUUGUGG 5'	Clivagem
pvu-MIR-390	Phvul.005G073800	3.0	PTHR27000:SF24 - PHYTOSULFOKINE RECEPTOR 2	5' AAGCUCAGGAGGGGAUAGCGCC 3'                 :     :   :   :   :   :     3' UUCGAGUUCUUCUUGUUGUGG 5'	Clivagem
pvu-MIR-390	Phvul.003G060600	3.0	PTHR27001:SF36 - PROLINE-RICH RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE PERK12-RELATED	5' AAGCUCAGGAGGGGAUAGCGCC 3'                 :     :       :   :   -     3' UUCGAGUUCUCCUGUUGGGG 5'	Clivagem

pvu-MIR-390	Phvul.008G122200	3.0	PTHR27000:SF92 - HIGHLY SIMILAR TO RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE-RELATED	5' AAGCUCAGGAGGGGAUAGCGCC 3'   -       :    -    3' UUAGAGUCCUCCUUAUCCCGG 5'	Clivagem
pvu-MIR-390	Phvul.007G067700	3.0	PF00560//PF07714//PF08263 - Leucine Rich Repeat (LRR_1) // Protein tyrosine kinase (Pkinase_Tyr) // Leucine rich repeat N-terminal domain (LRRNT_2)	5' AAGCUCAGGAGGGGAUAGCGCC 3'     -       :      -    3' UUCAAGUCCUCCUUAUCGGGG 5'	Clivagem
pvu-MIR-390	Phvul.008G126000	3.0	Proteína não identificada	5' AAGCUCAGGAGGGGAUAGCGCC 3'        : ::   :-  - 3' UUCGAGUCUUUUCUAUUUCGA 5'	Clivagem
pvu-MIR-390	Phvul.003G045000	3.0	PTHR10358//PTHR10358:SF8 - ENDOSULFINE // SUBFAMILY NOT NAMED	5' AAGCUCAGGAGGGGAUAGCGCC 3'     -  :   :   : -- 3' UUCGAUUCUCCUUAUUGCUA 5'	Clivagem
pvu-MIR-390	Phvul.009G082300	3.0	K02221 - YggT family protein (yggT)	5' AAGCUCAGGAGGGGAUAGCGCC 3'         -       -   :-  3' UUCGAGUCGUCCCUAACGUCG 5'	Clivagem
pvu-MIR-390	Phvul.001G249400	3.0	PTHR23012:SF50 - RING/FYVE/PHD ZINC FINGER-CONTAINING PROTEIN	5' AAGCUCAGGAGGGGAUAGCGCC 3'  -        -    :-- 3' UACGAGUCCUCCUCUCGUCC 5'	Clivagem
pvu-MIR-390	Phvul.007G271700	3.0	K14509 - ethylene receptor (ETR, ERS)	5' AAGCUCAGGAGGGGAUAGCGCC 3'        :-      - -- 3' UUCGAGUUGUCCCUAUCUCUU 5'	Clivagem
pvu-MIR-390	Phvul.009G018800	3.0	PTHR22792:SF2 - LA-RELATED PROTEIN 1	5' AAGCUCAGGAGGGGAUAGCGCC 3'   : :      - -  -- 3' UUUGGUCCUCCCAAACGCUU 5'	Clivagem

pvu-MIR-393	Phvul.007G054900	2.5	PTHR24096:SF221 - PROTEIN ACS-13, ISOFORM C	5' AUCAUGCUAUCCCUUUGGAU 3' -   :     :  3' AAGUAUGAUAGGGGGACCUU 5'	Clivagem
pvu-MIR-393	Phvul.007G095900	2.5	K18182 - cytochrome c oxidase assembly protein subunit 16 (COX16)	5' AUCAUGCUAUCCCUUUGGAU 3'       -       -    3' UAGUACGUUAGGGAAAGCUU 5'	Clivagem
pvu-MIR-393	Phvul.006G113100	2.5	PTHR23130:SF97 - CYTOCHROME B561/FERRIC REDUCTASE TRANSMEMBRANE WITH DOMON RELATED DOMAIN	5' AUCAUGCUAUCCCUUUGGAU 3'      :     :-:  3' UAGUACGGUAGGGAAACUUUU 5'	Clivagem
pvu-MIR-393	Phvul.008G162900	3.0	PTHR10887:SF369 - DNA2/NAM7 HELICASE FAMILY PROTEIN	5' AUCAUGCUAUCCCUUUGGAU 3'    :        -       3' UAGUGUGAUAGGG-AACCUA 5'	Clivagem
pvu-MIR-396	Phvul.010G052400	1.0	Proteína não identificada	5' AAGCUCAAGAAAGCUGUGGGA 3'            : :-- 3' UUCGAGUUCUUCGAUACUAG 5'	Clivagem
pvu-MIR-396	Phvul.003G168301	1.5	Proteína não identificada	5' AAGCUCAAGAAAGCUGUGGGA 3'     -            :  3' UUCAAGUUCUUCGACACCUU 5'	Clivagem
pvu-MIR-396	Phvul.006G003400	2.5	KOG0472 - Leucine-rich repeat protein	5' AAGCUCAAGAAAGCUGUGGGA 3'      :      -  : : :- 3' UUCGAGUUUUUCUAUAUCUC 5'	Clivagem
pvu-MIR-396	Phvul.011G015600	3.0	PTHR15907:SF35 - GENE1000 PROTEIN- RELATED	5' AAGCUCAAGAAAGCUGUGGGA 3'    :-              --- 3' UUCGGCUUCUUCGACACAAA 5'	Clivagem
pvu-MIR-396	Phvul.009G025700	3.0	K13414 - mitogen- activated protein kinase kinase kinase 1, plant (MEKK1P)	5' AAGCUCAAGAAAGCUGUGGGA 3'             -  : :-:  3' UUCGAGUUCUUCUAUAUGUU 5'	Clivagem

pvu-MIR-396	Phvul.008G279300	3.0	PTHR27007:SF21 - L-TYPE LECTIN-DOMAIN CONTAINING RECEPTOR KINASE S.7-RELATED	5' AAGCUCAAGAAAGCUGUGGGA 3' -     : -  :-- 3' AUCGAGUUCUUUGCCACUGG 5'	Clivagem
pvu-MIR-396	Phvul.009G261600	3.0	K14790 - nucleolar protein 9 (NOP9)	5' AAGCUCAAGAAAGCUGUGGGA 3'      :-  :--- 3' UUCGAGUUCUUUCUACGUGGU 5'	Clivagem
pvu-MIR-396	Phvul.L001232	3.0	PTHR14269:SF15 - HYDROLASE FAMILY PROTEIN / HAD-SUPERFAMILY PROTEIN	5' AAGCUCAAGAAAGCUGUGGGA 3'   :     :-  : -- 3' UUUGAGUUCUUUC-ACAUCGA 5'	Clivagem
pvu-MIR-396	Phvul.006G085533	2.0	PF02201//PF03004//PF03126 - SWIB/MDM2 domain (SWIB) // Plant transposase (Ptta/En/Spm family) (Transposase_24) // Plus-3 domain (Plus-3)	5' AAGAAAGCUGUGGGAGAAUAUGGC 3'      : : -  -  : 3' UUCUUUCGAUACUCACUUACACUU 5'	Clivagem
pvu-MIR-396	Phvul.002G020300	2.5	PTHR22050 - RW1 PROTEIN HOMOLOG	5' AAGAAAGCUGUGGGAGAAUAUGGC 3'   :     : : - ---- 3' UUUUUUCGACGCCUUCUUCUUAUG 5'	Clivagem
pvu-MIR-396	Phvul.003G163000	2.5	PF00646 - F-box domain (F-box)	5' AAGAAAGCUGUGGGAGAAUAUGGC 3' -     : : - --- 3' GUCUUUCGGUACUCUCUUAAGGU 5'	Clivagem
pvu-MIR-396	Phvul.002G218000	3.0	PTHR14255:SF3 - SULFITE EXPORTER TAUE/SAFE FAMILY PROTEIN	5' AAGAAAGCUGUGGGAGAAUAUGGC 3'      : : : : : : -- 3' UUCUUUUGGUACUUUCUUGUACAA 5'	Clivagem

pvu-MIR-396	Phvul.003G271500	3.0	PTHR23500:SF96 - MONOSACCHARIDE- SENSING PROTEIN 2	5' AAGAAAGCUGUGGGAGAAUAUGGC 3'  -   :       ---  -  3' UCCUUUUGACACCCUCUCAUAACU 5'	Clivagem
pvu-MIR-396	Phvul.006G211600	3.0	PTHR31234:SF8 - EXPRESSED PROTEIN	5' AAGAAAGCUGUGGGAGAAUAUGGC 3'   :     ---   --- ---  3' UUUUUUCGACUCCCUCUUUUUCCA 5'	Repressão traducional
pvu-MIR-396	Phvul.007G161600	3.0	-	5' AAGAAAGCUGUGGGAGAAUAUGGC 3'   :   :  : ---   --- :- 3' UUUUUUUGAUAUCCCUUAUCCUA 5'	Clivagem
pvu-MIR-396	Phvul.009G219800	3.0	K11878 - proteasome assembly chaperone 4 (PSMG4, PAC4)	5' AAGAAAGCUGUGGGAGAAUAUGGC 3'      :  ---   ---  -:  3' UUCUUUUGACCCCCUAUUACGUCC 5'	Repressão traducional
pvu-MIR-396	Phvul.006G158500	3.0	PTHR10044:SF98 - DETERIN	5' AAGAAAGCUGUGGGAGAAUAUGGC 3'        :--- --- --- 3' UUCUUUCGACAUUGUCUUCUAGU 5'	Clivagem
pvu-MIR-477	Phvul.011G160000	1.5	PTHR22904:SF374 - TPR REPEAT-CONTAINING THIOREDOXIN TTL1- RELATED	5' UCCCUCAAAGGCUUCCAGUA 3'      ---   ---   ---  3' AGGGAGAUUCCGAAGGUCAC 5'	Clivagem
pvu-MIR-477	Phvul.004G130300	2.0	PTHR33414:SF2 - PLASTID MOVEMENT IMPAIRED1	5' UCCCUCAAAGGCUUCCAGUA 3' -       --- ---  3' CGGGAGUUUCCGAAGGUGAA 5'	Clivagem
pvu-MIR-477	Phvul.003G102300	2.0	PF01535//PF13041 - PPR repeat (PPR) // PPR repeat family (PPR_2)	5' UCCCUCAAAGGCUUCCAGUA 3'        :  ---  :  3' AGGGAGUUUCUGACGGUUAG 5'	Clivagem
pvu-MIR-477	Phvul.009G134400	2.5	PF01535//PF13041 - PPR repeat (PPR) // PPR repeat family (PPR_2)	5' UCCCUCAAAGGCUUCCAGUA 3'        :    --- ---  3' AGGGAGUUUUCGAACAUCAC 5'	Clivagem
pvu-MIR-477	Phvul.003G208600	3.0	14494 - DELLA protein (DELLA)	5' UCCCUCAAAGGCUUCCAGUA 3' -   ---   ---   :  3' UGGGUGUUUCCGAAGGUUAU 5'	Clivagem

pvu-MIR-477	Phvul.005G154500	3.0	PF03514 - GRAS domain family (GRAS)	5' UCCCUCAAAGGCUUCCAGUA 3'           -         :         -   3' AGGGAGGUUCCGGAGGUCCU 5'	Clivagem
pvu-MIR-477	Phvul.004G130100	3.0	PTHR33414:SF2 - PLASTID MOVEMENT IMPAIRED1	5' UCCCUCAAAGGCUUCCAGUA 3' -           -                 : - 3' CGGGAGUAUCCGAAGGUCGA 5'	Clivagem
pvu-MIR-477	Phvul.006G040500	3.0	K01696 - tryptophan synthase beta chain (trpB)	5' UCCCUCAAAGGCUUCCAGUA 3'     -     -                     - 3' AGAGAAUUUCCGAAGGUCAC 5'	Clivagem
pvu-MIR-482	Phvul.009G100800	2.5	Proteína não identificada	5' AGAAUUUGUGGGAAUGGGCUGA 3'       -   : :                     :   3' UCUCAGGCACCCUUACCCGAUU 5'	Clivagem
pvu-MIR-482	Phvul.009G165800	2.5	Proteína não identificada	5' AGAAUUUGUGGGAAUGGGCUGA 3' -               : :           :     : :   3' ACUUAACGUCUUACUCGGUU 5'	Clivagem
pvu-MIR-482	Phvul.001G086200	2.5	Proteína não identificada	5' AGAAUUUGUGGGAAUGGGCUGA 3'   :           :     :         : :     - - - 3' UUUUAAAUAUCUCUUUAUUCGUUC 5'	Clivagem
pvu-MIR-482	Phvul.007G050900	2.5	PF00069//PF01657 - Protein kinase domain (Pkinase) // Salt stress response/antifungal (Stress-antifung)	5' AGAAUUUGUGGGAAUGGGCUGA 3'                 :       -         - - - - 3' UCUUAAACAUCUGACCCUUA 5'	Clivagem
pvu-MIR-482	Phvul.001G209300	3.0	PTHR31707:SF38 - PECTINESTERASE/PECTINESTERASE INHIBITOR 20-RELATED	5' AGAAUUUGUGGGAAUGGGCUGA 3'                 :   :     -         - : :   3' UCUUAAACGCUCUGACCCUGUU 5'	Clivagem
pvu-MIR-482	Phvul.002G237300	3.0	PTHR31194//PTHR31194:SF5 - SHN SHINE , DNA BINDING / TRANSCRIPTION	5' AGAAUUUGUGGGAAUGGGCUGA 3'                 :   :         - - - - - 3' UCUUAAACAUCUUUACCAUCAU 5'	Clivagem

			<b>FACTOR // SUBFAMILY NOT NAMED</b>		
pvu-MIR-482	Phvul.010G059200	3.0	PTHR11040:SF70 - METAL HOMEOSTASIS FACTOR ATX2	5' AGAAUUUGUGGGAAUGGGCUGA 3'         - : :                     - - - 3' UCUUUGGUACCCUUACCCGUUA 5'	Clivagem
pvu-MIR-482	Phvul.007G234500	3.0	<b>PTHR12542:SF41 - EXOCYST SUBUNIT EXO70 FAMILY PROTEIN A3-RELATED</b>	5' AGAAUUUGUGGGAAUGGGCUGA 3'                         -   : :   -   -   3' UCUUAAACACCCUCAUUCAAGU 5'	Clivagem
pvu-MIR-482	Phvul.010G142300	3.0	PTHR10544//PTHR10544:SF1 - 60S RIBOSOMAL PROTEIN L28 // SUBFAMILY NOT NAMED	5' AGAAUUUGUGGGAAUGGGCUGA 3'                   :         -   : - - - - 3' UCUUAAACAUCUUUACUCCAA 5'	Clivagem
pvu-MIR-482	Phvul.006G063100	3.0	<b>K12349 - neutral ceramidase (ASAH2)</b>	5' AGAAUUUGUGGGAAUGGGCUGA 3'                         - : :   - - - - 3' UCUUAAACACCCUUUUUCCUAU 5'	Clivagem
pvu-MIR-482	Phvul.008G283700	3.0	<b>K12349 - neutral ceramidase (ASAH2)</b>	5' AGAAUUUGUGGGAAUGGGCUGA 3'                   :         -     : - - - - 3' UCUUAAACAUCUUUCCUCUAU 5'	Clivagem
pvu-MIR-1512	Phvul.001G202500	2.5	Proteína não identificada	5' CAU AACUGAAA UUCU UAAAGC 3'       -     : :                     - - 3' GUAAUGGUUUUAAGAAUUUAC 5'	Clivagem
pvu-MIR-1512	Phvul.004G088400	3.0	4.4.1.4 - Alliin lyase / L-cysteine sulfoxide lyase	5' CAU AACUGAAA UUCU UAAAGC 3'                 :           :     - - - - 3' GUAUUGAUUUUAAGGAUCGUA 5'	Clivagem
pvu-MIR-1512	Phvul.009G050100	3.0	PTHR24349//PTHR24349:SF90 - SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE // SUBFAMILY NOT NAMED	5' CAU AACUGAAA UUCU UAAAGC 3'             :         :         - - - - 3' GUAUUGGCUUUGAGAAUAGGU 5'	Clivagem

pvu-MIR-1512	Phvul.010G057100	3.0	PF00069//PF00954//PF01453 - Protein kinase domain (Pkinase) // S-locus glycoprotein domain (S_locus_glycop) // D-mannose binding lectin (B_lectin)	5' CAUAACUGAAAUUCUAAAGC 3' -     :-   : -  3' UUAUUGACUAAAGGAUUUGG 5'	Repressão traducional
pvu-MIR-1512	Phvul.003G034200	3.0	PF06880 - Protein of unknown function (DUF1262) (DUF1262)	5' CAUAACUGAAAUUCUAAAGC 3'    -  : :     -  3' GUAGUGGUUUUGAGAAUUUGG 5'	Clivagem
pvu-MIR-1512	Phvul.010G093800	3.0	PTHR10774//PTHR10774:SF58 - EXTENDED SYNAPTOTAGMIN-RELATED // SUBFAMILY NOT NAMED	5' CAUAACUGAAAUUCUAAAGC 3' -     :-:: : - 3' UUAUUGACUUAAAGGUUUUA 5'	Clivagem
pvu-MIR-1512	Phvul.002G130500	3.0	PF13401 - AAA domain (AAA 22)	5' CAUAACUGAAAUUCUAAAGC 3' -     :     -: : - 3' AUAUUGAUUUUAAGUGUUUUC 5'	Clivagem
pvu-MIR-1512	Phvul.010G127200	3.0	K03025 - DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC6 (RPC6, POLR3F)	5' CAUAACUGAAAUUCUAAAGC 3'      : : - : : - 3' GUAUUGGUUUUGAAAGUUUUA 5'	Clivagem
pvu-MIR-2111	Phvul.008G212400	2.5	PF01535//PF13041 - PPR repeat (PPR) // PPR repeat family (PPR 2)	5' GUCCUUGGGAUGCAGAUUA 3'  :     :     : :  3' CGGGAACUCUACGUUUGGU 5'	Clivagem
pvu-MIR-2111	Phvul.005G014200	2.5	K13457 - disease resistance protein RPM1 (RPM1, RPS3)	5' GUCCUUGGGAUGCAGAUUA 3'      : :    : :  3' CAGGAGUCCU AUGUCUGGU 5'	Clivagem
pvu-MIR-2111	Phvul.005G014701	2.5	K13457 - disease resistance protein RPM1 (RPM1, RPS3)	5' GUCCUUGGGAUGCAGAUUA 3'      : :    : :  3' CAGGAGUCCU AUGUCUGGU 5'	Clivagem

pvu-MIR-2111	Phvul.004G160600	2.5	PTHR12433 - PROSTATE TUMOR OVEREXPRESSED GENE 1 PTOV1	5' GUCCUUGGGAUGCAGAUUA 3'           :           -   - 3' CAGGAACCUUACGUCUUAC 5'	Clivagem
pvu-MIR-2111	Phvul.003G261400	2.5	PTHR13208 - MEDIATOR OF RNA POLYMERASE II TRANSCRIPTION SUBUNIT 4	5' GUCCUUGGGAUGCAGAUUA 3'           : :           : -   3' CAGGAACUUUACGUCUGUU 5'	Clivagem
pvu-MIR-2111	Phvul.001G112700	2.5	PTHR30620//PTHR30620:SF58 - PERIPLASMIC BETA-GLUCOSIDASE-RELATED // SUBFAMILY NOT NAMED	5' GUCCUUGGGAUGCAGAUUA 3'   :         : :           -     3' CGGGAACUUUACGUCUCAU 5'	Clivagem
pvu-MIR-2111	Phvul.002G058701	3.0	K19022 - AP-5 complex subunit beta-1 (AP5B1)	5' GUCCUUGGGAUGCAGAUUA 3' -       :       :           : :   3' AAGGGACCUUACGUCUGGU 5'	Clivagem
pvu-MIR-2111	Phvul.002G130732	3.0	PTHR23155//PTHR23155:SF505 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED	5' GUCCUUGGGAUGCAGAUUA 3'                           -     - - 3' CAGGAACCCUACGUGUACC 5'	Clivagem
pvu-MIR-4416	Phvul.011G107800	3.0	PTHR31241:SF2 - DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN 2A-RELATED	5' CUAGGUGAGAGCGACCCGU 3'       : :   :                 : - 3' GAUUUAUUCUCGCUGGGUC 5'	Clivagem
pvu-MIR-5037	Phvul.004G130300	1.0	PTHR33414:SF2 - PLASTID MOVEMENT IMPAIRED1	5' CCUCAAGGCUUCCACUACUG 3'                             -   : : 3' GGAGUUUCCGAAGGUGAAGGU 5'	Clivagem

pvu-MIR-5037	Phvul.004G046200	2.0	PF00122//PF00689//PF00690//PF12710 - E1-E2 ATPase (E1-E2_ATPase) // Cation transporting ATPase, C-terminus (Cation_ATPase_C) // Cation transporter/ATPase, N-terminus (Cation_ATPase_N) // haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD)	5' CCUCAAAAGGCUUCCACUACUG 3'     -       :   -- 3' GGAAUUUCCGAAGGUGGUGUU 5'	Clivagem
pvu-MIR-5037	Phvul.003G208600	2.5	K14494 - DELLA protein (DELLA)	5' CCUCAAAAGGCUUCCACUACUG 3'    -       -      : 3' GGUGUUUCCGAAGGUUAUGAU 5'	Clivagem
pvu-MIR-5037	Phvul.006G182000	2.5	PF00046//PF02791//PF05066//PF15612//PF15613//PF15614 - Homeobox domain (Homeobox) // DDT domain (DDT) // HB1, ASXL, restriction endonuclease HTH domain (HARE-HTH) // WSTF, HB1, ltc1p, MBD9 motif 1 (WHIM1) // WSTF, HB1, ltc1p, MBD9 motif 2 (WHIM2) // WSTF, HB1, ltc1p, MBD9 motif 3 (WHIM3)	5' CCUCAAAAGGCUUCCACUACUG 3'       :    -      3' GGAGUUUCCGAGGGGUUGAC 5'	Clivagem
pvu-MIR-5037	Phvul.002G326900	2.5	PTHR33414:SF2 - PLASTID MOVEMENT IMPAIRED1	5' CCUCAAAAGGCUUCCACUACUG 3'       -       -    : : 3' GGAGUAUCCGAAGGUGAAGGU 5'	Clivagem

pvu-MIR-5037	Phvul.002G206500	2.5	1.3.5.5 - 15-cis-phytoene desaturase / Plant-type phytoene desaturase	5' CCUCAAGGCUUCCACUACUG 3'             -             -   :- 3' GGAGUUUACGAAGGUGAGGGG 5'	Clivagem
pvu-MIR-5037	Phvul.010G034600	2.5	PTHR22812 - CHROMOBX PROTEIN	5' CCUCAAGGCUUCCACUACUG 3'             :         -     -     -- 3' GGAGUUUUCGAAGUUGUUGUA 5'	Clivagem
pvu-MIR-5037	Phvul.009G104850	3.0	Proteína não identificada	5' CCUCAAGGCUUCCACUACUG 3'         -       :   :         :     :: 3' GGAGGUUCUGGAGGUGGUGGU 5'	Clivagem
pvu-MIR-5037	Phvul.007G247200	3.0	PTHR19241//PTHR19241:SF283 - ATP-BINDING CASSETTE TRANSPORTER // SUBFAMILY NOT NAMED	5' CCUCAAGGCUUCCACUACUG 3'               -     :           -   -   3' GGAGUUUCGGAGGGUGAAGUC 5'	Clivagem
pvu-MIR-5037	Phvul.001G160800	3.0	KOG4249 - Uncharacterized conserved protein	5' CCUCAAGGCUUCCACUACUG 3'     :         : :   :     -         -- 3' GGGGUUUUUGGAGGCGAUGCG 5'	Clivagem
pvu-MIR-5037	Phvul.004G022300	3.0	PTHR11654:SF82 - PROTEIN NRT1/ PTR FAMILY 5.8-RELATED	5' CCUCAAGGCUUCCACUACUG 3'     : -                         -   -- 3' GGGUUUUCGAAGGUGACGUU 5'	Clivagem
pvu-MIR-10405	Phvul.006G013300	2.5	PTHR13256:SF16 - N-ACETYLTRANSFERASE 9	5' UUGUUUCUUUAAAAAGGAC 3'           :       -             :   - 3' AACAAGGAAGAUUUUUUUUU 5'	Repressão traducional
pvu-MIR-10405	Phvul.011G003000	2.5	PTHR23359:SF72 - ADENYLATE KINASE FAMILY PROTEIN	5' UUGUUUCUUUAAAAAGGAC 3'   : :           :             : :   - 3' AGUAAAGAGUAUUUUUUUUUA 5'	Clivagem
pvu-MIR-10405	Phvul.007G038400	2.5	PTHR10177:SF251 - CYCLIN-D3-1	5' UUGUUUCUUUAAAAAGGAC 3'           : -                   :   - 3' AACAAGUAAUAAUUUUUUUU 5'	Clivagem
pvu-MIR-10405	Phvul.004G061350	2.5	Proteína não identificada	5' UUGUUUCUUUAAAAAGGAC 3'                     -         : :   -	Clivagem

				3' AACAAAGAAUAAUUUUUUUA 5'	
pvu-MIR-10405	Phvul.005G070000	2.5	K00852 - ribokinase (rbsK, RBKS)	5' UUGUUUCUUAUAAAAAGGAC 3'           :   -           :   - 3' AACAAAGGAAUUUUUUCUUA 5'	Repressão traducional
pvu-MIR-10405	Phvul.001G164000	2.5	PTHR31284:SF15 - HAD SUPERFAMILY, SUBFAMILY IIIB ACID PHOSPHATASE	5' UUGUUUCUUAUAAAAAGGAC 3' -     :               -         - 3' UACGAAGAAUAAUUUCCUU 5'	Clivagem
pvu-MIR-10405	Phvul.002G029300	2.5	K11093 - U1 small nuclear ribonucleoprotein 70kDa (SNRP70)	5' UUGUUUCUUAUAAAAAGGAC 3'           : :           : -   3' AACAAAGGGUAAUUUUUUAUU 5'	Clivagem
pvu-MIR-10405	Phvul.009G240666	2.5	PF12796//PF13962 - Ankyrin repeats (3 copies) (Ank_2) // Domain of unknown function (PGG)	5' UUGUUUCUUAUAAAAAGGAC 3'                 -             -   - 3' AACAAAGAAGAUUUUUUCAUC 5'	Repressão traducional
pvu-MIR-10405	Phvul.008G264400	2.5	PF07714//PF11721//PF13855 - Protein tyrosine kinase (Pkinase_Tyr) // Di-glucose binding within endoplasmic reticulum (Malectin) // Leucine rich repeat (LRR_8)	5' UUGUUUCUUAUAAAAAGGAC 3'           : :           - :     - 3' AACAAAGGGUAAUUUUCUCUA 5'	Clivagem
pvu-MIR-10405	Phvul.009G097600	3.0	PTHR10257:SF25 - SERINE/THREONINE PROTEIN PHOSPHATASE 2A 57 KDA REGULATORY SUBUNIT B' IOTA ISOFORM	5' UUGUUUCUUAUAAAAAGGAC 3' -     :           :           - - 3' UACGAAGAAUGUUUUUCCCA 5'	Clivagem
pvu-MIR-10405	Phvul.006G202800	3.0	Proteína não identificada	5' UUGUUUCUUAUAAAAAGGAC 3'       :               -         - -	Clivagem

				3' AACGAAGAAUAUAUUUCCAC 5'	
pvu-MIR-10405	Phvul.001G249500	3.0	Proteína não identificada	5' UUGUUUCUUAUAAAAAGGAC 3'   :    -       : :- 3' AAUAAAGUAUAUUUUUUUUU 5'	Clivagem
pvu-MIR-10405	Phvul.007G077400	3.0	KOG1333 - Uncharacterized conserved protein	5' UUGUUUCUUAUAAAAAGGAC 3'    -   :       : :- 3' AACCAAGAGUAUUUUUUUUU 5'	Clivagem
pvu-MIR-10405	Phvul.005G046350	3.0	PF12796 - Ankyrin repeats (3 copies) (Ank_2)	5' UUGUUUCUUAUAAAAAGGAC 3' :       ---  :-   3' GACAAAGAAUAUUUAUUUAUG 5'	Clivagem
pvu-MIR-10405	Phvul.007G179600	3.0	K15718 - linoleate 9S- lipoxygenase (LOX1_5)	5' UUGUUUCUUAUAAAAAGGAC 3'      :      -  : -  3' AACAAAGAAUAUUUAUUUCCG 5'	Clivagem
pvu-MIR-10405	Phvul.011G147100	3.0	PF00954//PF01453//PF0 7714//PF08276 - S-locus glycoprotein domain (S_locus_glycop) // D- mannose binding lectin (B_lectin) // Protein tyrosine kinase (Pkinase_Tyr) // PAN-like domain (PAN_2)	5' UUGUUUCUUAUAAAAAGGAC 3'  :       ---  :-- 3' AGCAAAGAAUAUUCUUCUAA 5'	Clivagem
pvu-MIR-10405	Phvul.006G034600	3.0	K02874 - large subunit ribosomal protein L14 (RP-L14, MRPL14, rplN)	5' UUGUUUCUUAUAAAAAGGAC 3'   :    :    -  : - 3' AAUGAAGAGUAUUUAUCUUU 5'	Clivagem
pvu-MIR-10405	Phvul.009G190533	3.0	PTHR24078//PTHR2407 8:SF175 - DNAJ HOMOLOG SUBFAMILY C MEMBER // SUBFAMILY NOT NAMED	5' UUGUUUCUUAUAAAAAGGAC 3'   :     : :    -: :- 3' AAUAAAGAGUGUUUUUGUUU 5'	Clivagem

pvu-MIR-10405	Phvul.003G250200	3.0	PF04784//PF14389 - Protein of unknown function, DUF547 (DUF547) // Leucine-zipper of ternary complex factor MIP1 (Lzipper-MIP1)	5' UUGUUUCUUAUAAAAAGGAC 3'         :     :       -       :   - 3' AACAGAGGGUAUUUAUUCUUC 5'	Clivagem
pvu-MIR-10405	Phvul.003G150400	3.0	PTHR10788:SF30 - ALPHA,ALPHA-TREHALOSE-PHOSPHATE SYNTHASE [UDP-FORMING] 11-RELATED	5' UUGUUUCUUAUAAAAAGGAC 3'               -     :         -     - 3' AACAAAGUAUGUUUUUGCUU 5'	Clivagem
pvu-MIR-10405	Phvul.008G178500	3.0	6.3.2.6 - Phosphoribosylaminoimid azolesuccinocarboxamid e synthase / SAICARs	5' UUGUUUCUUAUAAAAAGGAC 3'                   -         -   :   - 3' AACAAAGAAUCUUUUCCUUU 5'	Repressão traducional
pvu-MIR-10405	Phvul.001G253300	3.0	K07904 - Ras-related protein Rab-11A (RAB11A)	5' UUGUUUCUUAUAAAAAGGAC 3'               :         -     - :   - 3' AACAAAGGAUAUUCUUAUUA 5'	Clivagem
pvu-MIR-10405	Phvul.008G250800	3.0	PTHR31087:SF16 - PROTEIN LURP-ONE-RELATED 7	5' UUGUUUCUUAUAAAAAGGAC 3'       :                 - -   :     - 3' AACGAAGAAUAUUCUUCUUCU 5'	Clivagem

Legenda: Pareamentos completos são simbolizados por |; - representa mismatches, e : simboliza o pareamento woble. Em cima está o miRNA maduro em 5' para 3' e embaixo, o sitio alvo do mRNA, de 3' para 5'. Transcritos grifados em amarelo são os alvos relacionados com resposta imune em plantas (utilizados na elaboração da figura 4).