

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ANA LUÍSA FERREIRA CAMARGOS**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE miRNAs E COMPONENTES DA VIA  
DE RNA EM ESPÉCIES DE NEMATOIDES**

**PATOS DE MINAS – MG**

**MAIO DE 2023**

**ANA LUÍSA FERREIRA CAMARGOS**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE miRNAs E COMPONENTES DA VIA  
DE RNA EM ESPÉCIES DE NEMATOIDES**

Dissertação de Mestrado  
apresentada ao Programa de Pós-  
graduação em Biotecnologia  
como requisito parcial para a  
obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia.

**Prof. Dr. Matheus de Souza Gomes**

**PATOS DE MINAS – MG**

**MAIO DE 2023**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

C172 2023	<p>Camargos, Ana Luísa Ferreira, 1995- Identificação e caracterização de miRNAs e componentes da via de RNA em espécies de nematóides [recurso eletrônico] : Identification and characterization of miRNAs and RNA pathway components in nematode species / Ana Luísa Ferreira Camargos. - 2023.</p> <p>Orientador: Matheus de Souza Gomes. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Biotecnologia. Modo de acesso: Internet. Disponível em: <a href="http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.300">http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.300</a> Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Biotecnologia. I. Gomes, Matheus de Souza, 1981-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pósgraduação em Biotecnologia. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 60</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:  
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



## ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biotecnologia				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico				
Data:	06/06/2023	Hora de início:	09h04	Hora de encerramento:	11h10
Nome do Discente:	Ana Luísa Ferreira Camargos				
Título do Trabalho:	Identification and characterization of miRNAs and RNA pathway components in nematode species				
Área de concentração:	Biotecnologia				
Linha de pesquisa:	Bioinformática e Biologia Molecular aplicada à genômica, transcriptômica e proteômica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Identificação e caracterização de microRNAs e genes envolvidos no processamento de RNAs não codificadores de proteínas em eucariotos				

Reuniu-se, por meio de vídeo-conferência, no Campus Patos de Minas, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, assim composta: Dr<sup>a</sup> Lívia Carneiro Fidelis Silva e Prof. Dr. Fábio Ribeiro Queiroz e Prof. Dr. Matheus de Souza Gomes, orientador da candidata. Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Prof. Dr. Matheus de Souza Gomes, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Matheus de Souza Gomes, Professor(a) do Magistério Superior**, em 06/06/2023, às 11:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Fábio Ribeiro Queiroz, Usuário Externo**, em 06/06/2023, às 11:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Livia Carneiro Fidélis Silva, Usuário Externo**, em 19/06/2023, às 10:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4547527** e o código CRC **E6E5F34A**.

---

Referência: Processo nº 23117.038966/2023-11 SEI nº 454752

*Dedico esse trabalho aos meus pais, Carlos e Regilene, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando, incentivando e acreditando em mim. Ao meu marido, Leandro, por todo suporte e companheirismo. E, também, a todos que estiveram comigo durante essa jornada.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que esteve sempre presente em minha vida, pelas oportunidades que me são dadas e por me permitir concluir esse trabalho me dando forças para superar todos os desafios e dificuldades.

Aos meus pais, Carlos e Regilene, por todos os ensinamentos, compreensão, incentivo e apoio. Por acreditarem em mim e por todo o amor em mim depositado.

Ao meu marido, Leandro, pela presença e paciência sempre que precisei, por todo companheirismo e amor.

Ao meu irmão, Marco Túlio, por todo apoio.

Ao meu filho, Léo, e meu sobrinho, João Gabriel, pela renovação de energias e alegria e por me incentivarem a lutar pelo futuro.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia por dividirem seus conhecimentos comigo.

Ao professor Dr. Matheus de Souza Gomes pela orientação, incentivo e ensinamentos passados a mim.

E a todos aqueles que estiveram comigo nessa jornada e torcem pelo meu sucesso.

## RESUMO

Os fitonematoides são importantes patógenos capazes de parasitar plantas causando danos severos, incluindo a morte. Algumas espécies causam grandes perdas econômicas na agricultura mundial e ocorrem em todas as principais culturas de importância econômica. Embora existam alguns métodos usados para controlar nematoides parasitas de plantas, suas eficiências são limitadas. Uma abordagem promissora é o uso de técnicas de silenciamento gênico. No entanto, uma utilização bem sucedida desse método requer uma compreensão melhor dos miRNAs e de suas vias de processamento em fitonematoides. Esse estudo teve como objetivo identificar e caracterizar, utilizando análise *in silico*, genes envolvidos na via de silenciamento gênico mediada por miRNAs, além de moléculas selecionadas de miRNAs e seus precursores em espécies do gênero *Meloidogyne*, incluindo *M. arenaria*, *M. enterolobii*, *M. floridensis*, *M. graminicola*, *M. hapla*, *M. incognita* e *M. javanica*. Um total de 115 proteínas envolvidas na via de processamento miRNAs foram identificadas. Proteínas chave da via como RNases III e Argonata foram caracterizadas. Os domínios conservados, sítios ativos e relações filogenéticas dessas proteínas foram analisados para prever suas atividades funcionais nas células. Adicionalmente, precursores putativos e miRNAs maduros foram identificados nos genomas de *M. enterolobii* e *M. arenaria*. A análise revelou 86 sequências putativas de miRNA em *M. enterolobii*, 96 no primeiro genoma de *M. arenaria*, 41 no segundo genoma e 45 no terceiro genoma. A família de miRNA mir-87 foi analisada para *M. enterolobii* e *M. arenaria*. A conservação da sequência e distribuição filogenética de cada família sugere a presença de miRNAs em todos os genomas de nematoides. No geral, esses resultados fornecem uma melhor compreensão dos papéis essenciais dos miRNAs em processos regulatórios baseados em miRNA em nematoides parasitas de plantas e seu potencial como alvos para técnicas de silenciamento de genes para controle dessa praga.



## ABSTRACT

Plant-parasitic nematodes are highly damaging pathogens that can infect and cause severe damage to plants, including death. They are responsible for significant economic losses in global agriculture and are found in major crops of economic importance. While various methods are used to control plant-parasitic nematodes, their efficiency is limited. One promising approach is the use of gene silencing techniques. However, successful implementation of this method requires a thorough understanding of miRNAs and their processing pathways in plant-parasitic nematodes. This study aimed to identify and characterize the genes involved in the miRNA pathway in *Meloidogyne* species, including *M. arenaria*, *M. enterolobii*, *M. floridensis*, *M. graminicola*, *M. hapla*, *M. incognita*, and *M. javanica*, using *in silico* analysis. A total of 115 proteins involved in the miRNA pathway were identified, and key pathway proteins, such as RNases III and Argonaute were characterized. The conserved domains, active sites, and phylogenetic relationships of these proteins were analyzed to predict their functional activities in cells. Additionally, putative precursors and mature miRNAs were identified in the genomes of *M. enterolobii* and *M. arenaria*. The analysis revealed 86 putative miRNA sequences in *M. enterolobii*, 96 in the first genome of *M. arenaria*, 41 in the second genome, and 45 in the third genome. The mir-87 miRNA family was analyzed for *M. enterolobii* and *M. arenaria*. The sequence conservation and phylogenetic distribution of each family suggested the presence of miRNAs in all nematode genomes. Overall, these results provide a better understanding of miRNAs' essential roles in miRNA-based regulatory processes in plant-parasitic nematodes and their potential as targets for gene silencing techniques for controlling this pest.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1 Problema de pesquisa .....</b>	<b>10</b>
<b>1.2 Hipótese .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3 Objetivos.....</b>	<b>11</b>
1.3.1 Objetivo geral.....	11
1.3.2 Objetivos específicos.....	12
<b>1.4 Justificativa .....</b>	<b>12</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Nematoides .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 Fitonematoides .....</b>	<b>15</b>
<b>2.3 Manejo de nematoides.....</b>	<b>19</b>
<b>2.4 Gênero <i>Meloidogyne</i> .....</b>	<b>21</b>
<b>2.5 Genomas de nematoides.....</b>	<b>23</b>
<b>2.6 MiRNA.....</b>	<b>26</b>
<b>2.7 MiRNA em nematoides .....</b>	<b>28</b>
<b>CAPÍTULO ÚNICO.....</b>	<b>33</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>79</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Problema de pesquisa

Os nematoides parasitas de plantas (fitonematoides) são importantes patógenos capazes de parasitar vários órgãos da planta como caule, folhas e principalmente as partes subterrâneas (raízes, rizomas, tubérculos, etc). Eles causam, muitas vezes, danos severos na planta levando a diminuição da produtividade e, em alguns casos, a morte. Cada espécie causa danos específicos de acordo com seu modo e ciclo de vida, levando ao aparecimento de sintomas também específicos. A maioria deles, por viver no solo, atacam as partes subterrâneas das plantas, o que causa vários efeitos que prejudicam profundamente o bom funcionamento do organismo, como por exemplo, atrapalham o transporte de água, seiva e conseqüentemente o metabolismo da planta. Algumas espécies causam grandes danos econômicos na agricultura mundial de até 100 bilhões de dólares por ano. Elas ocorrem em todas as principais culturas de importância econômica, algumas possuem hábitos polífagos enquanto outras ocorrem em apenas um lugar específico.

Apesar de os fitonematoides já serem considerados fatores limitantes à produção agrícola desde a década de 1930, seu controle ainda não é bem estabelecido e eficiente. Atualmente esse controle é feito utilizando produtos nematicidas sintéticos (químicos) que são bastantes danosos ao meio ambiente. Eles são constituídos de compostos de alta toxicidade, contaminando o solo, corpos aquáticos, além dos efeitos residuais para outras formas de vida, incluindo os mamíferos. Além disso, os nematicidas químicos possuem alto custo e não são considerados eficientes pelo fato de que as espécies mais importantes de fitonematoides ficam dentro das raízes das plantas não entrando em contato com o produto. Outra forma de controle utilizada nos dias de hoje é a rotação de culturas, porém esta também não é muito eficiente pelo uso indevido do solo, do aumento da área envolvida na produção e devido ao hábito polífago de alguns nematoides. Ainda se utiliza variedades de plantas que possuem genes de resistência naturais a nematoides, porém a avaliação destas cultivares mostra apenas resistência específica a determinadas raças ou patótipos de fitonematoides.

Outra forma de controle de fitonematoides que vem começando a ser estudada e utilizada é a técnica de RNAi e silenciamento gênico, onde utiliza-se de moléculas de RNAs (miRNAs) sintéticas que são capazes de se ligarem a outras (mRNAs) produzidas pelo nematoide inativando-as, assim elas diminuem o cumprimento de sua função e prejudicam o

funcionamento do organismo da praga. Para a utilização eficiente dessa técnica é necessário o conhecimento profundo do organismo do fitonematoide e das moléculas de miRNA que são produzidas por ele e que possuem grande importância na vida e na capacidade de parasitismo do nematoide. Assim, o problema enfatizado neste trabalho envolve o estudo e a caracterização das moléculas de miRNA que são produzidas por fitonematoides, encontrando aquelas que possuem grande importância para vida e capacidade de parasitismo dos fitonematoides tornando possível utiliza-las posteriormente em técnicas de RNAi para o controle desse patógeno.

## 1.2 Hipótese

Os miRNAs foram descritos pela primeira vez em nematoides (*C. elegans*) e desde então foram atribuídas a estes pequenos RNAs várias funções de grande importância em diversos organismos, incluindo funções imprescindíveis para a vida e para a capacidade de manter o modo de vida dos seres vivos, como por exemplo o miRNA lin-4 que é de suma importância para o desenvolvimento de *C. elegans*. Com o advento da genômica vários genomas foram descritos, inclusive de fitonematoides podendo ser utilizados para estudo e predição de miRNAs.

Desta forma, a hipótese existente no presente trabalho é que fitonematoides possuem a maquinaria de processamento de pequenos RNAs, que produzam miRNAs e que estas moléculas estão envolvidas na regulação de processos biológicos nestes organismos, sendo importantes para manter não só sua vida, mas seu estilo de vida parasita. Além disso, infere-se que seus miRNAs estejam inseridos em seus genomas e por isso possam ser caracterizados e estudados *in silico*.

## 1.3 Objetivos

### 1.3.1 Objetivo geral

Identificar e caracterizar, utilizando análise *in silico*, genes presentes em nematoides envolvidos na via de silenciamento gênico mediada por miRNAs, além das moléculas de miRNAs, seus precursores e seus alvos.

### 1.3.2 Objetivos específicos

- Aplicar um algoritmo otimizado para busca e caracterização de proteínas envolvidas na via de miRNA utilizando dados de proteoma predito de nematoides;
- Analisar a conservação das proteínas envolvidas na via de biogênese de miRNAs em nematoides utilizando análises de domínios conservados, análise de resíduos do sítio ativo e análise filogenética;
- Aplicar algoritmo otimizado para busca e caracterização de miRNAs e seus precursores utilizando dados de genoma de nematoides;
- Analisar a conservação dos miRNAs e seus precursores em nematoides utilizando conservação de estruturas primária e secundária e análise filogenética;

### 1.4 Justificativa

Os nematoides fitoparasitas tem ganhado muita atenção por causarem grandes prejuízos na agricultura mundial e conseqüentemente grandes impactos econômicos para vários países. Essa atenção vem pelo fato de estarem presentes em praticamente todos os ambientes e estarem espalhados por todo o globo e por não possuírem forma de controle eficiente, com custo justo, que não cause prejuízos e danos ao meio ambiente, além de não serem tóxicas para animais e seres humanos.

Dessa maneira, o conhecimento acerca das moléculas produzidas pelos nematoides (por exemplo miRNAs) permitem uma melhor compreensão sobre o funcionamento desses organismos e como esses seres vivem e mantem suas formas de vida (parasitas). Com esse conhecimento básico sobre os miRNAs produzidos pelos fitonematoides torna-se possível pensar em novas formas de combate a esta praga da agricultura que possam ser mais eficientes, com custos mais baixos e sem danos ao meio ambiente e a outras formas de vida.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Nematoides

Nematoides são os animais multicelulares mais abundantes no planeta Terra considerando o número de indivíduos (COGHLAN, 2005; SOUZA, 2018). Pertencem a um grande filo de metazoários com um total de espécies estimado entre 100.000 e 1.000.000 (LAMBSHEAD, 1993; ROSSI, 2014), sendo que somente 20 mil já foram identificados e descritos (EISENBACK, 1998; TROJAN, VAZ, 2014). Estima-se que aproximadamente 7,5 bilhões de nematoides podem ser encontrados em um hectare de solo, considerando a profundidade de 20cm (DECRAEMER e HUNT, 2006; FERRAZ, SILAMAR, GUIMARÃES, 2016). Possuem distribuição geográfica cosmopolita, abrangendo todos os ecossistemas conhecidos e praticamente todos os nichos disponíveis na biosfera, ocupando ambientes marinho, dulcícola e terrestre (RUPPERT e BARNES, 1993; KAMITANI, 2010). São considerados aquáticos (TROJAN, VAZ, 2014).

São estudados desde o final da década de 50, onde pesquisadores de todo o mundo avançavam na descoberta de diferentes espécies (NIELSEN, 1967; FIGUÊREDO, 2018). São invertebrados, na maioria pequenos e de corpo filiforme e pertencem ao filo Nematoda (DE LEY & BLAXTER, 2004; CAIXETA, 2015). Porém há espécies maiores como *Placentonema gigantíssima*, que mede em média 9 metros e é encontrada na placenta de cachalotes (GUBANOV, 1951; ROSSI, 2014), além de terem a presença de pseudoceloma (WOOD, 1988; ROSSI, 2014). No entanto, há uma diversidade enorme de estruturas associadas com a biologia do hábito de vida desses animais, como ornamentação da cutícula e aparelhos bucais (LEY, 2006; ROSSI, 2014). Seu corpo é, basicamente, formado por dois tubos, um dentro do outro, e no espaço entre eles está o pseudoceloma, onde se localizam os órgãos reprodutores e um líquido que preenchem a cavidade - denominado líquido celomático. Tal líquido tem a função de favorecer a distribuição de nutrientes pelo intestino, atua na excreção e funciona como esqueleto hidrostático (SMYTH, 1994; BARROS, 2015). A ordenação taxonômica mais recente divide os nematoides em três classes: Chromadorea, Enoplea e Dorylaimea, que compreendem 31 ordens diferentes (RUGGIERO et al., 2015; COELHO, 2015).

Já em relação ao seu crescimento e desenvolvimento, os adultos são maiores do que os juvenis, sendo que o formato e tamanho pode variar de espécie para espécie. A maioria das espécies de nematoides podem ser observadas facilmente sob microscópio de dissecação com aumento de 40-60x. As demais espécies são observadas detalhadamente em maiores aumentos

da microscopia (600-1000x). Por serem tão pequenos, são considerados um dos organismos mais difíceis de serem identificados, o que dificulta a observação de características chave (TROJAN, VAZ, 2014). O desenvolvimento é direto, só nos parasitas aparecem larvas secundárias (BARROS, 2015).

Muitos dos animais conhecidos deste grupo são parasitas, e foram amplamente estudados justamente pela sua importância médica, no caso dos parasitas de seres humanos e econômica, no caso de parasitas de animais e plantas. No entanto, há uma diversidade muito grande de nematoides de vida livre, sendo o mais conhecido deles a espécie *Caenorhabditis elegans* (ROSSI, 2014), por ser muito utilizado em pesquisas pela sua facilidade de manejo em laboratório. As comunidades de nematoides de solo são poli específicas e são constituídas principalmente por cinco grupos tróficos: os parasitas de plantas, os bacteriófagos, os fungívoros, os predadores e os onívoros, sendo os dois primeiros os mais abundantes (YEATES et al., 1993; CAIXETA, 2015). Os nematoides terrestres se apresentam em grande número na superfície do terreno, e sua população diminui com o aumento da profundidade. Apesar disso, esses parasitas encontram-se em maior número próximo às raízes das plantas. (BARNES, 2005; FIGUÊREDO, 2018).

Os nematoides têm papel central na cadeia alimentar do solo, influenciando processos ecológicos de vários níveis tróficos (MOORE e RUITER, 1991; FIGUÊREDO, 2018). Assim, os nematoides podem ter um impacto positivo por fazerem serviços ecológicos de ciclagem dos nutrientes e da matéria orgânica, disponibilizando-os para seu posterior aproveitamento na cadeia trófica. Além disso, a diversidade de espécies presentes num determinado ecótopo pode ser indicador confiável das condições ambientais (BONGERS, T; BONGERS, M, 1998; KAMITANI, 2010).

O impacto negativo nas atividades econômicas humanas também é muito relevante. A infecção por nematoides gastrintestinais tem se apresentado como uma das principais causas de perdas econômicas para os produtores de pequenos ruminantes no Brasil e em outras partes do mundo (GIRÃO et al., 1992; COOP & KYRIAZAKIS, 2001; NERY, DUARTE, MARINS, 2009). Pode-se estimar perdas de até 10% das colheitas unicamente provocadas por nematoides parasitas de plantas (HODDA, 2007; KAMITANI, 2010). Nos Estados Unidos, foram verificadas reduções de até 30% na produção de soja, em condições experimentais no campo. No Brasil há relatos de reduções de até 50% na produção de soja em áreas infestadas por *Pratylenchus* (REVISTA PLANTIO DIRETO, 2007; GOULART, 2008). Ainda que subestimadas, as perdas anuais atribuídas aos fitonematoides são elevadas. Em um total de 185

países, 126 (68%) tiveram o produto interno bruto (PIB) inferior a US\$ 125 bilhões em 2013, a exemplo de Angola, Bolívia, Bulgária, Costa do Marfim, Croácia, Equador, Gana, Guatemala, Marrocos, Paraguai, Quênia, Porto Rico, Sérvia e Uruguai (THE WORLD BANK, 2013). Apesar disso, a quantidade de recurso financeiro destinado ao ensino, pesquisa e extensão em nematologia é bem menor do que o valor perdido, sendo inferior a 0,2% – US\$ 125 milhões (SASSER e FRECKMAN, 1987; FERRAZ, SILAMAR; GUIMARÃES, 2016).

## 2.2 Fitonematoides

Aproximadamente 4.100 espécies de nematoides são capazes de parasitar plantas (DECRAEMER e HUNT, 2006) – comumente denominados fitonematoides (FERRAZ, SILAMAR, GUIMARÃES, 2016). Os fitonematoides são importantes patógenos de plantas que parasitam órgãos aéreos, folhas, caules e especialmente os órgãos subterrâneos, como as raízes, bulbos, tubérculos e rizomas (FREITAS; NEVES; OLIVEIRA, 2007; FIGUÊREDO, 2018). Algumas espécies de parasitas de plantas são reconhecidas por seus danos às culturas agrícolas e plantações florestais, são parasitas obrigatórios das plantas e se alimentam internamente ou externamente de suas raízes. Os efeitos causados são geralmente específicos em cada espécie e incluem alterações que podem ocorrer na morfologia das raízes, no transporte de água e no metabolismo (COLLEMAN e WALL, 1989; FIGUÊREDO, 2018). A maioria dos nematoides, como são habitantes de solos, tem maior aptidão por causar danos em partes subterrâneas das plantas; poucas são as espécies que causam danos em partes aéreas. É interessante ressaltar que justamente por esse hábito de danificar as raízes, e ainda podendo se alimentar exteriormente ou internamente, acabam por bloquear a passagem de seiva, causando sintomas de deficiência nas folhas ou mesmo murchas (TROJAN, VAZ, 2014).

Quase todas as espécies de nematoides parasitas, possuem um estilete oco e tem funcionamento muito similar ao de uma agulha hipodérmica, que permite a remoção de nutrientes do interior das células de plantas. O estilete também é usado para penetrar diretamente os tecidos de plantas, permitindo que o nematoide escave os tecidos de plantas e se mova em direção aos sítios de alimentação preferidos. As glândulas localizadas na parte posterior do esôfago produzem e secretam compostos através do estilete nas células das plantas (TROJAN, VAZ, 2014).

Os nematoides que se alimentam externamente nas raízes são denominados ectoparasitas e aqueles que se alimentam dentro das raízes são os endoparasitas. Dentro de



ambos os tipos de alimentação, algumas espécies podem ser migratórias, movendo-se ao longo de seu ciclo de vida, enquanto que outras são sedentárias e se posicionam em um lugar estabelecendo um local permanente de alimentação (TROJAN, VAZ, 2014). Com ênfase no tipo de estratégia alimentar, podemos classificar os nematoides em ectoparasitas migradores e sedentários, semi-endoparasitas migradores e sedentários e endoparasitas migradores e sedentários (LAMBERT E BEKAL, 2002). Os nematoides ectoparasitas vivem nas superfícies externas das plantas usando o estilete para se alimentar das células das raízes. Os semi-endoparasitas são compostos de nematoides que penetram parcialmente na raiz da planta hospedeira e formam sítios de alimentação (*Rotylenchulus*, *Tylenchulus*, *Helicotylenchus*, *Xiphinema*, *Belonolaimus*, *Longidorus*, *Trichodorus* e *Hemicycliophora*, são exemplos desses dois grupos). Finalmente, os endoparasitas sedentários constituem o grupo considerado mais adaptado ao parasitismo de plantas e de difícil controle, por passar a maior parte do ciclo de vida no interior das raízes onde induzem estruturas de alimentação especializadas (*Meloidogyne*, *Globodera*, *Heterodera*) (SOUZA, 2008). E ainda temos os endoparasitas migratórios que invadem completamente as raízes, alimentando-se das células e migrando no interior dos tecidos radiculares (*Pratylenchus*, *Radopholus* e *Hirschmanniella*) (FERRAZ, SILAMAR, GUIMARÃES, 2016).

Em relação aos nematoides parasitas de plantas, pode-se falar que gastam grande parte de seus ciclos de vida no solo. A textura, estrutura e composição química do solo possuem importância primária na determinação do número e tipos de nematoides parasitas de plantas encontrados. No solo, os nematoides fitoparasitas movem-se apenas em pequenas distâncias, sendo que a disseminação a longas distâncias são geralmente pelo movimento do solo (TROJAN, VAZ, 2014), por exemplo, quando partes do solo são carregados por máquinas agrícolas até outras regiões. Os sintomas induzidos em plantas infectadas são inespecíficos e podem ser confundidos com outras causas, como, por exemplo, nanismo, murcha e deficiência nutricional; a dispersão depende principalmente do transporte de solo ou de materiais de plantio contaminados com o patógeno (FERRAZ ET AL., 2010; FERRAZ, SILAMAR; GUIMARÃES, 2016). De forma geral, as plantas parasitadas ficam enfraquecidas em razão da retirada de nutrientes pelos fitonematoides. Os ferimentos, as lesões e a formação de sítios de alimentação próximos aos tecidos vasculares reduzem a capacidade das raízes em absorver água e nutrientes. Conseqüentemente, a parte aérea não se desenvolve normalmente, com redução na produção e, em alguns casos, culminando com a morte da planta. Além disso, as culturas em que os órgãos subterrâneos são comercializados podem sofrer drástica redução na produção

quando atacadas por nematoides, uma vez que os sintomas resultantes da ação do patógeno depreciam o produto. Lesões de *Pratylenchus spp.* em batata e deformações induzidas por *Meloidogyne spp.* em raízes de cenoura, batata e beterraba são exemplos de danos qualitativos causados por nematoides em produtos agrícolas (BRIDGE e STARR, 2007; FERRAZ, SILAMAR; GUIMARÃES, 2016).

O ciclo de vida dos fitonematoídeos consiste, de forma geral, de seis estágios fenológicos: ovo, quatro larvais (juvenis) e adultos. A larva do segundo estágio (L2 ou juvenil 2 J2) é a fase infectiva, penetra na raiz e migra por força mecânica do estilete e degradação enzimática para a formação do sítio de alimentação modificando as células vegetais para que funcionem como dreno de nutrientes (GHEYSEN; FENOLL, 2002; VAN DER EYCKEN et al., 1996; FRAGOSO, 2007). A larva 2 se diferencia em L3 e L4 assumindo forma salsichóide. Quando em condições de parasitismo desfavoráveis, o L4 se diferencia em macho adulto e abandona o hospedeiro, pelo contrário, quando as condições são boas o L4 se diferencia em fêmea adulta que completa seu ciclo de vida depositando em torno de 2000 ovos (WILLIAMSON; GLEAON, 2003; FRAGOSO, 2007).

Os problemas com nematoides em geral são mais frequentes em climas quentes e úmidos, sendo que ambos se encaixam na zona ótima de reprodução e a temperatura ideal para o desenvolvimento dos nematoides varia entre 20 a 30 °C. A preferência por climas quentes é devido ao fato de os nematoides não conseguirem regular a temperatura interna de seus corpos. A temperatura e umidade do solo é que determina a duração do ciclo de vida dos nematoides, sendo que, para penetração radicular a temperatura ideal é de aproximadamente 28°C, para eclosão é de aproximadamente 24 °C e para o desenvolvimento varia entre 28 a 31 °C (TROJAN, VAZ, 2014). Os nematoides também podem, indiretamente, causar danos às culturas agrícolas ao atuarem como agentes de predisposição ou vetores de outros patógenos (FERRAZ, SILAMAR, GUIMARÃES, 2016).

Os nematoides causam perdas nas principais culturas de importância econômica ou de subsistência em todos os continentes. Alguns são cosmopolitas e polífagos, tal qual o nematoídeo de galhas (*Meloidogyne spp.*), enquanto outros ocorrem em poucos locais, como espécies de *Nacobbus*, ou possuem gama de hospedeiros restrita, como *Heterodera carotae*, que parasita apenas cenoura (RAVICHANDRA, 2014; FERRAZ, SILAMAR, GUIMARÃES, 2016). Os nematoides podem atacar culturas de interesse econômico e trazer sérios prejuízos (ANTONIO, 1992; YAMASHITA et al., 1999), como na agricultura qualitativamente e quantitativamente, podendo causar perdas anuais médias à produção agrícola mundial, estimadas em 12%, o que

corresponde a bilhões de dólares de prejuízo (WEISCHER e BROWN, 2001), mas geralmente esse número é superior. Em termos mundiais, considera-se que essas perdas sejam de aproximadamente 100 bilhões de dólares por ano (SASSER e FRECKMAN, 1987; APUD FREITAS, 2007; TROJAN, VAZ, 2014). O reconhecimento do papel dos nematoides como importantes fatores limitantes à produção agrícola ocorreu a partir das décadas de 1930 e 1940 (MANZANILLA-LÓPEZ et al., 2004; RAVICHANDRA, 2014), principalmente em função da expansão das áreas de cultivo e do aumento da demanda por alimentos, acentuados após a Segunda Guerra Mundial (FERRAZ, SILAMAR, GUIMARÃES, 2016). Os fitonematoides endoparasitas sedentários, dividido em 3 gêneros *Globodea*, *Heterodera* e *Meloidogyne*, são os patógenos mais danosos para várias culturas pelo mundo afora (SASSER, 1980) representando perdas na agricultura mundial de 125 bilhões de dólares anualmente. Dentre os nematoides formadores de galhas, *Meloidogyne incognita*, em virtude da sua distribuição mundial (SASSER et al., 1983; TRUDGILL, 1995), reprodução apomítica e vasta gama de plantas hospedeiras (EHWAETI et al., 1999; JEPSON, 1987), é provavelmente o patógeno de plantas cultivadas mais importante (TRUDGILL e BLOK, 2001; FRAGOSO, 2007).

Os nematoides ainda não possuem controle definido e aplicável universalmente, já que as vias disponíveis são consideradas muito difíceis e caras, além de ambientalmente indesejadas, principalmente por sua relação de toxicidade com o solo (TROJAN, VAZ, 2014). A aplicação de nematicidas em áreas infestadas contribui para a contaminação ambiental e a intoxicação de seres humanos e outros animais (FERRAZ, SILAMAR; GUIMARÃES, 2016). Esta dificuldade de controle não está só voltada às ferramentas disponíveis pela ciência, mas também tem relação com a diagnose, epidemiologia e identificação destes infestantes (TROJAN, VAZ, 2014). A similaridade morfológica/morfométrica e o tamanho reduzido dos nematoides limita a identificação taxonômica por meio de técnicas usando microscopia de luz (OLIVEIRA et al., 2011), ainda comumente usadas em procedimentos de rotina. Nas últimas décadas, avanços na área de biotecnologia contribuíram para aumentar a rapidez e a acurácia da diagnose de nematoides usando técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações e amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) (FERRAZ, SILAMAR; GUIMARÃES, 2016).

Tabela 1- Estimativas de perdas anuais causadas por fitonematoides em culturas agrícolas em todo o mundo.

Perdas anuais (%)			
Tomate	20,6	Milheto	11,8
Quiabo	20,4	Plantas ornamentais	11,1
Banana	19,7	Beterraba açucareira	10,9
Inhame	17,7	Feijão	10,9
Coco	17,1	Goiaba	10,8
Berinjela	16,9	Algodão	10,7
Cana-de-açúcar	15,3	Soja	10,6
Caupi	15,1	Cacau	10,5
Mamão	15,1	Batata Doce	10,2
Café	15,0	Milho	10,2
Abacaxi	14,9	Arroz	10,0
Fumo	14,7	Mandioca	8,4
Citrus	14,2	Chá	8,2
Melão	13,8	Forageira	8,2
Grão-de-bico	13,7	Trigo	7,0
Guandu	13,2	Sorgo	6,9
Videira	12,5	Cevada	6,3
Batata	12,2	Aveia	4,2
Pimenta	12,2	Centeio	3,3
Amendoim	12,0	Outras culturas	17,3
<b>Média: 12,3%</b>			

Fonte: Adaptado de Sasser e Freckman (1987) e Ferraz, Salimas; Guimarães (2016).

### 2.3 Manejo de nematoides

A principal forma de controle de fitonematoides atualmente é a utilização de nematicidas sintéticos (químicos) que são bastante danosos ao meio ambiente, possuindo em sua composição compostos de alta toxicidade, que contaminam o solo, corpos aquáticos, além dos efeitos residuais para outras formas de vida, incluindo os mamíferos (JOHNSON, 2011; SOUZA JÚNIOR, 2012). Em adição, a cutícula e outras estruturas dos nematoides são impermeáveis a várias moléculas orgânicas e existem poucos nematicidas no mercado (CHITWOOD, 2002; LIMA, 2011). Além disso, possuem um alto custo e sua eficiência é

comprometida, uma vez que os fitonematoides endoparasitas apresentam comportamento endógeno, ficando protegidos no interior das raízes das plantas durante a maior parte do seu ciclo de vida dificultando a ação da maioria dos nematicidas (JAMES, 2008; SOUZA JÚNIOR, 2012).

Outra forma de controle que vem sendo explorada é a utilização de variedades de plantas que possuem genes de resistência naturais a fitonematoides, porém a avaliação destas cultivares mostra apenas resistência específica de determinadas raças ou patótipos de fitonematoides (JAMES, 2008; SOUZA JÚNIOR, 2012). Métodos de controle cultural, como a rotação de culturas, não tem demonstrado resultados satisfatórios devido ao uso indevido do solo, do aumento da área envolvida na produção, devido ao hábito polífago de alguns nematoides, especialmente espécies apomíticas como *M. incógnita* e *M. javanica*, além do menor retorno financeiro ao produtor (JAMES, 2008; JAMES, 2009; SOUZA JÚNIOR, 2012).

Com o advento da engenharia genética, utilizando-se de estratégias moleculares que visam induzir resistência em plantas a diversos patógenos, vem se abrindo novos campos de estudos e possibilidades. O desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas (GM), com resistência a nematoides, pode aumentar a produtividade, diminuir os custos e reduzir os impactos do uso de nematicidas (LOURENÇO, 2014; BORGES, 2016).

As técnicas atuais de controle de fitonematoides apresentam diversas limitações, sendo que é essencial o desenvolvimento de técnicas mais efetivas, seguras e duráveis. Recentemente, a estratégia de silenciamento gênico, ou interferência mediada por RNA dupla fita (dsRNA), tem se mostrado muito promissora para o controle de nematoides. Tal estratégia se baseia na transformação genética de plantas para que essas expressem dsRNA com sequência específica de genes-alvo do fitonematoide (MCCARTER, 2008; FERREIRA et al., 2012).

A Genômica comparativa e funcional tem auxiliado no desenvolvimento de novas técnicas para detecção e controle de fitonematoides (ABAD et al., 2008; MCCARTER, 2008, DA SILVA; FIGUEIREDO, 2018). As novas tecnologias para controle de nematoides têm como objetivos: buscar diferentes fontes de resistência natural nos genomas de espécies não hospedeiras; empregar novas formas de resistência; atuar na expressão de proteínas ou peptídeos para o silenciamento de genes (RNAi); buscar compostos nematicidas menos tóxicos ao ambiente; e, explorar microrganismos antagonistas como possíveis agentes de biocontrole (ESCOBAR & FENOLL, 2015; TOPALOVIC & HEUER, 2018; DA SILVA; FIGUEIREDO, 2018).

Os avanços recentes tornam possível explorar aspectos mais específicos das interações planta-nematoide. Assim, podem ser desenvolvidas estratégias de controle que impeçam a infecção do nematoide, sua progressão nos tecidos, seu estabelecimento e a redução da capacidade de alimentação/reprodução. O conhecimento de quais genes estão relacionados ao parasitismo do nematoide também pode ser usado para desenvolvimento de novos princípios químicos com atuação mais precisa (DA SILVA; FIGUEIREDO, 2018).

O manejo de fitonematoides em campos de cultivo é cada dia mais destacado como demanda em empresas de biotecnologia. Com os avanços nos estudos biotecnológicos, a liberação de variedades comerciais com novas formas de resistência a nematoides, novos modos de aplicação de agentes de biocontrole e novas moléculas químicas podem se tornar rapidamente disponíveis como produto comercial (DA SILVA; FIGUEIREDO, 2018).

#### **2.4 Gênero *Meloidogyne***

*Meloidogyne* é um nome de origem grega e significa "fêmea em forma de maçã" (MOENS et al., 2009). O gênero de nematoides *Meloidogyne* é considerado o mais importante entre os parasitas de plantas (SASSER E FRECKMAN, 1987; RICH, et al., 2009). Isso, principalmente devido à sua ampla gama de hospedeiros. São conhecidos por exceder 3000 espécies vegetais selvagens e cultivadas (HUSSEY E JANSSEN, 2002; RICH, et al., 2009). Os nematoides das galhas (RKN), do gênero *Meloidogyne*, são endoparasitas biotróficos e representam um dos gêneros mais polípagos e prejudiciais de nematoides fitoparasitos (SASSER, 1987; ELLING, 2013).

Aproximadamente 100 espécies nominais de *Meloidogyne* são conhecidas até o momento (KARSSSEN, 2002; PERRY et al., 2009; WESEMAEL et al., 2011; ELLING, 2013), mas dentro do gênero, *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* e *M. javanica* representam 95% de todas as infestações em terras agrícolas (HUSSEY E JANSSEN, 2002; RICH, et al., 2009).

Normalmente, eles se reproduzem e se alimentam de células vegetais vivas modificadas dentro das raízes das plantas, onde induzem pequenas a grandes galhas ou nós de raízes, daí seu nome "nematoide das galhas". Os sintomas acima do solo não são facilmente aparentes e podem ser semelhantes aos produzidos em qualquer planta que tenha um sistema radicular danificado e com defeito. Os hospedeiros podem estar fortemente infectados sem apresentar sintomas externos. A rápida taxa de desenvolvimento e reprodução desse gênero resulta, na maioria das

espécies de plantas, em várias gerações durante uma estação de cultivo, levando a danos severos às culturas (MOENS et al., 2009).

As infestações no campo por espécies do gênero *Meloidogyne* resultam em grandes danos econômicos (DANCHIN et al., 2013 ; BEBBER et al., 2014; SUSIČ et al., 2020) devido à ocorrência nanismo, falta de vigor e murchamento das plantas, pois a infecção afeta a absorção de nutrientes pelo sistema radicular. Sendo assim os nematoides das galhas atuam na redução ou perda de rendimento das culturas e também na qualidade do produto (MOENS et al., 2009), com perdas anuais globais estimadas de US\$ 110 bilhões ( DANCHIN et al., 2013 ; BEBBER et al., 2014; SUSIČ et al., 2020).

A fêmea madura de *Meloidogyne* deposita os ovos em um saco de ovos, que é constituído por uma matriz gelatinosa produzida por suas glândulas retais (BIRD, 1965; ELLING, 2013). Dentro do ovo, a embriogênese leva ao desenvolvimento de juvenis de primeiro estágio, que mudam e se desenvolvem em juvenis de segundo estágio (J2). Sob condições favoráveis, que são ditadas principalmente pela umidade e temperatura, J2 eclode e localiza as plantas hospedeiras (GOODELL, 1989; ELLING, 2013). J2 invadem as raízes na região de alongamento celular ou locais de ramificação da raiz e migram intercelularmente através do córtex. Quando atingem a endoderme, que representa uma barreira impenetrável para J2, primeiro migram em direção à ponta da raiz até atingir a região meristemática e, em seguida, retornam ao cilindro vascular. Em última análise, os J2 tornam-se sedentários e induzem mudanças profundas no tecido hospedeiro (BROWN, 2011; ELLING, 2013). Em hospedeiros compatíveis, cerca de meia dúzia de células vegetais são transformadas em células gigantes, que constituem o local de alimentação do nematoide e a única fonte de nutrição para o resto de seu ciclo de vida (PERRY, 2009; ELLING, 2013). Um sintoma típico da infecção por *Meloidogyne* é a formação de galhas nos locais de alimentação do nematoide. Depois que o local de alimentação foi estabelecido, J2 aumenta de tamanho e sofre mudas subsequentes em juvenis de terceiro e quarto estágio (J3 e J4), e após uma quarta e última muda em fêmeas ou machos adultos. Os machos adultos recuperam sua motilidade e são capazes de deixar a raiz, enquanto as fêmeas permanecem sedentárias. Os machos não são formados em todas as espécies e a reprodução pode ocorrer por partenogênese (ELLING, 2013).

Vários genomas de *Meloidogyne* spp. foram sequenciados (ABAD et al., 2008 ; LUNT et al., 2014 ; BLANC-MATHIEU et al., 2017; SZITENBERG et al., 2017 ) e revelaram que eles são aloploidos complexos com regiões de genoma heterozigoto duplicado e com

elementos transponíveis abundantes (BLANC-MATHIEU et al., 2017 ; SZITENBERG et al., 2017; SUSIČ et al., 2020).

## 2.5 Genomas de nematoides

O sequenciamento dos genomas dos nematoides de vida livre *C. elegans* (*C. ELEGANS* SEQUENCING CONSORTIUM, 1998), *C. briggsae* (STEIN et al., 2003) e *P. pacificus* (DIETERICH et al., 2008) forneceu sequências genômicas de referência para comparação com os nematoides parasitas de plantas (OPPERMAN et al., 2008). O genoma do nematoide *C. elegans* possui 97Mb e revela mais de 19000 genes, mais de 40% dos produtos proteicos encontram combinações significativas com outros organismos. Existe uma variedade de sequências repetidas, locais e dispersas. A distribuição distinta de algumas repetições e genes altamente conservados fornecem evidências para uma organização regional dos cromossomos (*C. ELEGANS* SEQUENCING CONSORTIUM, 1998).

Foi previsto aproximadamente 19.500 genes codificadores de proteínas no genoma de *C. briggsae* próximo ao encontrado em *C. elegans*. Destes, 12.200 possuem ortólogos de *C. elegans*, outros 6.500 possuem um ou mais homólogos com *C. elegans* claramente detectáveis e aproximadamente 800 genes de *C. briggsae* não têm correspondências detectáveis em *C. elegans*. Quase todos os RNAs não codificantes (ncRNAs) conhecidos são compartilhados entre as duas espécies. Os dois genomas exibem extensa colinearidade e a taxa de divergência parece ser maior nos braços cromossômicos do que nos centros (STEIN, LINCOLN et al., 2003).

O genoma do nematoide *P. pacificus* com 169 Mb e 23.500 genes codificadores de proteínas preditos é maior que o de *C. elegans* e o do parasita humano *B. malayi* (DIETERICH, 2008). O genoma de *P. pacificus* contém genes que codificam celulase e diapausina, e a atividade da celulase é encontrada em secreções de *P. pacificus*, indicando que as celulases podem ser encontradas em outros nematoides além de parasitas de plantas. O número relativamente maior de enzimas de desintoxicação e degradação em *P. pacificus* é consistente com seu estilo de vida necromênico e pode representar uma pré-adaptação para o parasitismo (DIETERICH, 2008).

A maioria dos nematoides possuem genomas que variam de 50 a 250 Mb (LEROY et al., 2003; COGHLAN, 2005). Alguns nematoides têm genomas tão grandes quanto os de



mamíferos, como o genoma de ~2100Mb de *P. univalens* (NIEDERMAIER e MORITZ, 2000; COGHLAN, 2005). Outros genomas de nematoides são pequenos, como o genoma de *B. mucronatus* com ~30Mb (LEROY et al., 2003; COGHLAN, 2005). A variação no tamanho do genoma no filo é provavelmente ainda maior, uma vez que os tamanhos foram estimados apenas para aproximadamente 50 espécies (LEROY et al., 2003; GREGORY, 2005, ANIMAL GENOME SIZE DATABASE; COGHLAN, 2005). A natureza compacta dos genomas dos nematoides pode ser devida a uma alta taxa de deleções espontâneas (WITHERSPOON e ROBERTSON, 2003; COGHLAN, 2005) e talvez à seleção para deleções (DENVER et al., 2004; COGHLAN, 2005). A maioria dos nematoides possui números cromossômicos haploides variando de  $n=4$  a  $n=12$  (WALTON, 1959; COGHLAN, 2005). Os cariótipos de aproximadamente 300 espécies foram estudados e apresentam muita variação cariotípica (ŠPAKULOVÁ e CASANOVA, 2004; COGHLAN, 2005). O menor número haploide é  $n=1$  em *P. univalens*, mas contagens muito altas são observadas em espécies poliploides em *Tylenchomorpha*. Por exemplo, uma raça de *Meloidogyne hapla* sequenciada é diploide e têm  $n=14$ , mas outra raça de *M. hapla* é poliploide com  $2n=45-48$  (DAVID BIRD; TRIANTAPHYLLOU, 1984; COGHLAN, 2005).

A maior parte da sequência reunida do nematoide *Meloidogyne incognita* de reprodução assexuada, totaliza 86 Mb, existe em pares de segmentos homólogos, mas divergentes. Isso sugere que as antigas regiões alélicas de *M. incognita* estão evoluindo para uma haploidia eficaz, permitindo novos mecanismos de adaptação (ABAD et al., 2008). O número e a diversidade de enzimas que degradam a parede celular de plantas em *Meloidogyne incognita* é sem precedentes em qualquer animal para o qual uma sequência genômica está disponível e pode derivar de múltiplas transferências horizontais de genes de fontes bacterianas (ABAD et al., 2008).

Com 54 Mb, *Meloidogyne hapla* representa não apenas o menor genoma de nematoide já concluído, mas também o menor metazoário, e define uma plataforma para elucidar mecanismos de parasitismo do maior grupo descontrolado de patógenos vegetais do mundo (OPPERMAN et al., 2008). O parasitismo de plantas parece ter surgido independentemente em três dos 12 principais clados de nematoides (HOLTERMAN et al., 2006; OPPERMAN et al., 2008). O genoma de *Meloidogyne hapla* codifica significativamente menos genes do que o nematoide de vida livre *C. elegans*, mas adquiriu horizontalmente de outros reinos numerosos genes suspeitos de estarem envolvidos em adaptações ao parasitismo (OPPERMAN et al.,

2008). Embora *M. hapla* e *C. elegans* divergiram há mais de 500 milhões de anos, são conservadas muitas vias de desenvolvimento e bioquímicas, incluindo aquelas para formação de dauer (foram descritas pela primeira vez como uma adaptação ao parasitismo para superar condições ambientais adversas e facilitar a dispersão (FUCHS, 1915) e RNAi (OPPERMAN et al., 2008). *M. hapla* possui 5.500 genes codificadores de proteínas a menos do que *C. elegans*. Observa-se várias famílias de genes que são significativamente menores em número do que as observadas em *C. elegans* e, então, substancia-se ainda mais a hipótese de que a transferência horizontal de genes desempenhou um papel na evolução do parasitismo (OPPERMAN et al., 2008). Um total de 38 sequências de proteínas tiveram correspondências significativas com o banco de dados não redundante de sequências peptídicas do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Muitas dessas correspondências referem-se às proteínas de nematoides parasitas de plantas sugeridas para desempenhar um papel no parasitismo (OPPERMAN et al., 2008).

Foi montado também o genoma de *Heterodera glycines* de 738 contigs em 123 Mb com anotações para 29.769 genes. O genoma contém um número significativo de repetições (34%), duplicadas em tandem (18,7 Mb) e eventos de transferência horizontal de genes (151 genes) (MASONBRINK et al., 2019). Especificamente, foi descoberto que os efetores (grupo de proteínas de nematoides que são secretadas nas células vegetais para modificar os processos hospedeiros (HUSSEY, 1989; MASONBRINK et al., 2019)) estão frequentemente associados a duplicações em tandem, transposons de DNA e retrotransposons de LTR (MASONBRINK et al., 2019).

No genoma de *Globodera rostochiensis* foram identificadas centenas de genes que podem ter sido adquiridos por transferências gênicas de origem não-metazoária, algumas das quais provavelmente desempenham papéis importantes no parasitismo de plantas (EVES-VAN DEN AKKER et al., 2016). Identificou-se efetores em *G. rostochiensis* e foi descoberto que eles frequentemente se agrupavam em 'ilhas efetoras' (EVES-VAN DEN AKKER et al., 2016). Os efetores, em geral, contêm mais mutações não-sinônimas. Foram previstos novos efetores, confirmados por hibridação *in situ*, em *G. rostochiensis* e identificados todos os supostos efetores de DOG (Dorsal Gland Box) dos genomas de nematoides de cisto disponíveis (EVES-VAN DEN AKKER et al., 2016).

## 2.6 MiRNA

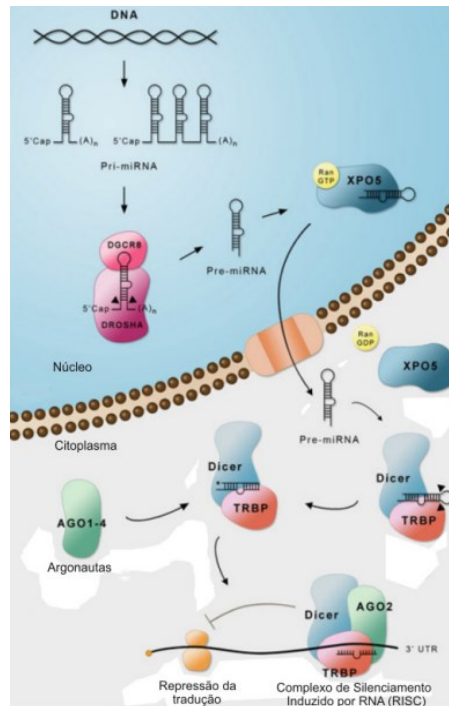
MiRNAs (miRNAs) são uma classe de pequenos RNAs não codificantes endógenos (BARTEL, 2009; CHEN, 2009) de fita simples que possuem de 18 a 25 nucleotídeos e que regulam a expressão gênica pós-transcricional e transcricionalmente (DASGUPT; CHATTERJEE, 2021). Os miRNAs regulam a expressão de genes alvo atuando principalmente ao nível pós-transcricional, por meio de interações RNA–RNA (HA et al., 2008). Tanto a clivagem quanto o mecanismo de repressão da tradução requerem uma complementaridade de pares de bases entre o miRNA e o seu RNA mensageiro (mRNA) alvo (VOINNET, 2009; MOREA, 2013).

Desde a descoberta do primeiro gene miRNA, *lin-4*, estudos com organismos modelos (como *C. elegans*, *D. melanogaster* e *Arabidopsis thaliana*) têm identificado a função biológica de diversos miRNAs (AMBROS, 2004; YING, 2004; COSTA; PACHECO, 2016). Mais de 800 miRNAs já foram experimentalmente descobertos em animais (LAGOS-QUINTANA, 2001; COSTA; PACHECO, 2016). Esses RNAs funcionam como reguladores de diversos processos dos eucariotos como proliferação, diferenciação, desenvolvimento e morte celular, interação entre vírus e célula hospedeira, metabolismo, conformação cromossômica, oncogênese entre outros (SCHWARZ, 2003; O'DONNELL; 2005; CAI, 2006; IORIO, 2007; CAMPBELL, 2009; COSTA; PACHECO, 2016).

A biogênese dos miRNAs (Figura 1) é iniciada primeiramente pela transcrição da sua unidade transcricional, genes codificantes de RNA, por meio da enzima RNA polimerase II, gerando um transcrito longo de RNA chamado de miRNA primário (pri-miRNA), que contém um ou vários transcritos (MELO; MELO, 2014; LINS, 2014). Após a transcrição, os pri-miRNAs são processados por uma RNase III chamada Droscha e uma proteína de ligação ao RNA dupla-fita DGCR8/Pasha (GREGORY, 2005; ZENG, 2004; COSTA, PACHECO, 2016), em precursores dupla-fita de aproximadamente 70 nucleotídeos de comprimento, os chamados pré-miRNAs, que possuem a forma de grampo de cabelo, ou haste-alça (AVNIT-SAGI, 2009; COSTA, PACHECO, 2016). O pré-miRNA é exportado do núcleo para o citoplasma pela Exportina-5 em mamíferos e possivelmente pela XPO-1 em *C. elegans* (LEE, AHN et al. 2003, YI, QIN et al. 2003, BUSSING, YANG et al. 2010; ARRUDA, 2018). O complexo enzimático Dicer, um membro da superfamília RNase III, juntamente com a proteína de ligação TAR (TRBP), medeia o processamento citoplasmático do pré-miRNA em miRNAs maduros, gerando um miRNA de fita dupla de 18 a 25 pb (LUND et al., 2004; LINS, 2014). Uma minoria dos miRNAs, chamados mirtrons, não requer Droscha para seu processamento, em vez disso,

são produzidos a partir de grampos intrônicos que são formados após splicing de genes codificadores de proteínas (BEREZIKOV et al. 2007; RUBY et al. 2007; DE WIT et al., 2009). O miRNA maduro que corresponde a uma das fitas do dúplex de aproximadamente 20pb é, então, incorporado em um grande complexo proteico chamado Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC – *RNA Induced Silencing Complex*) (LEE, 2001; COSTA; PACHECO, 2016). O complexo RISC é constituído em parte por enzimas helicases e proteínas Argonautas, que promove a separação das duas fitas. Desse modo, uma das fitas do dúplex permanece incorporada ao complexo RISC, como miRNA maduro (GREGORY, 2005; AVNIT-SAGI, 2009; COSTA, PACHECO; 2016). O miRNA maduro no complexo RISC interage com os mRNA alvos por complementaridade na região 3'UTR, para degradá-los ou reprimir sua tradução (SCHWARZ et al., 2003; LINS, 2014). O reconhecimento acontece com um grau de complementaridade imperfeito, com falta de complementaridade principalmente na parte central do miRNA. A complementaridade perfeita promove a clivagem do mRNA catalisada pela associação da proteína Argonauta ao complexo miRISC (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009; INUI et al., 2010; LINS, 2014). A repressão da tradução do mRNA ocorre quando a complementaridade é imperfeita e, por mecanismos ainda não elucidados, sugere-se que a repressão aconteça durante a elongação e o miRNA promova a dissociação entre os ribossomos e o mRNA (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009; INUI et al., 2010; LINS, 2014).

Figura 1 - Esquema da via de biogênese e função dos miRNA.



Fonte: adaptado de Melo e Melo (2014) e Lins (2014).

## 2.7 MiRNA em nematoides

Os miRNAs são altamente conservados em todo o reino animal (WHEELER et al. 2009, DE WIT et al., 2009); miR-100, por exemplo, é extremamente conservado entre eumetazoa (GRIMSON et al. 2008; DE WIT et al., 2009). Pasquinelli et al. (2000) mostraram que let-7 e um de seus alvos, lin-41, são amplamente conservados em animais, Moss e Tang (2003) mostraram que lin-28 é um alvo conservado de let-7 e lin-4 em mamíferos e nematoides (CHEN; RAJEWSKY, 2006; DE WIT et al., 2009). Esforços computacionais para clonagem aumentaram a descoberta de novos miRNAs (BEREZIKOV et al. 2006; DE WIT et al., 2009).

Os primeiros miRNAs foram descobertos por abordagens genéticas avançadas no nematoide *C. elegans* (LEE et al. 1993; DE WIT et al., 2009). Desde então, a disponibilidade de um genoma de referência em combinação com abordagens experimentais e computacionais resultou na descrição de 155 miRNAs nesta espécie (GRIFFITHS-JONES et al. 2008; DE WIT et al., 2009). Dentro do gênero *Caenorhabditis*, a maioria dos miRNAs é conservada entre as espécies estudadas (DE WIT et al., 2009).

Os miRNAs se ligam a proteínas argonautas para formar complexos efetores que têm como alvo, ácidos nucleicos contendo complementaridade parcial ou completa ao pequeno RNA. *C. elegans* (nematóide modelo) contém 25 argonautas pertencentes a três clados diferentes e múltiplas subfamílias distintas (YIGIT et al. 2006; SHI, ZHEN et al., 2013). MiRNAs maduros se associam ao clado AGO Argonautes ALG-1 e ALG-2 em *C. elegans* (GRISHOK et al. 2001; SHI, ZHEN et al., 2013).

Foi demonstrado que modificações em miRNAs envolvidos no desenvolvimento larval do nematóide *C. elegans*, como *lin-4* (BETHKE, FIELENBACH et al. 2009; ARRUDA, 2018), determinam a sobrevivência do verme (BOEHM e SLACK 2005; ARRUDA, 2018). Ao diminuir a atividade de *lin-4*, por exemplo, observa-se redução da sobrevivência com envelhecimento acelerado. Por outro lado, a super expressão de *lin-4* ou a inibição de seu principal alvo, o fator de transcrição LIN-14, levam ao aumento do tempo de vida do verme (BOEHM e SLACK, 2005; ARRUDA, 2018). Mais recentemente, demonstrou-se por meio de experimentos de sequenciamento em larga escala associado a análises de bioinformática em *C. elegans* que o perfil de expressão de miRNAs é modificado com o envelhecimento e que o silenciamento de *alg-1*, que prejudica especificamente a via de miRNAs, reduz a sobrevivência dos vermes (KATO, CHEN et al. 2011; ARRUDA, 2018).

O primeiro miRNA descrito em *C. elegans*, *lin-4*, controla as decisões sobre o destino das células hipodérmicas durante o desenvolvimento larval inicial (LEE RC, FEINBAUM, AMBROS, 1993; WIGHTMAN, HA, RUVKUN, 1993; WINTER et al., 2012). Da mesma forma, *C. elegans let-7* e os miRNAs relacionados (*mir-48*, *mir-84* e *mir-241*) também funcionam para regular o tempo dos eventos de desenvolvimento (REINHART et al., 2000; ABBOTT et al., 2005; WINTER et al., 2012). Um papel específico da célula foi definido para *C. elegans lis-6* e *mir-273*, que atuam sequencialmente para controlar a lateralidade dos neurônios quimiosensoriais (JOHNSTON, HOBERT, 2003; CHANG et al., 2004; WINTER et al., 2012).

Em *C. elegans* ainda foram descritos fenótipos iniciais de letalidade resultantes da perda combinada de *mir-35 - mir-42* (ALVAREZ-SAAVEDRA, HORVITZ, 2010; WINTER, 2012) e *mir-51-mir-56*, (ALVAREZ-SAAVEDRA, HORVITZ, 2010; SHAW et al., 2010; WINTER, 2012), bem como do movimento e defeito no tamanho do corpo resultante de mutação combinada de *mir-58*, *mir-80*, *mir-81* e *mir-82* (ALVAREZ-SAAVEDRA, HORVITZ, 2010; WINTER, 2012) demonstrado para *C. elegans mir-1*, que regula a sinalização sináptica nas

junções neuromusculares e influencia a sensibilidade ao levamisol (SIMON et al., 2008; WINTER, 2012).

Em *B. xylophilus* (nematóide parasita de planta) 57 miRNAs autênticos (20 conservados e 37 novos) foram descobertos por métodos computacionais e experimentais (HUANG, QI-XING et al. 2010). Foi a primeira descrição de miRNAs em fitonematóides. Muitos miRNAs de *B. xylophilus* são conservados com miRNAs de metazoários no miRBase. É possível agrupar todos os 57 miRNAs de *B. xylophilus* em 47 famílias de miRNA por conservação (HUANG, QI-XING et al. 2010).

Foram sequenciados os miRNAs de todos os cinco estágios do ciclo de vida de *M. incógnita* em um estudo feito por Subramanian et al. em 2016 (tabela 2). Um total de 9325 famílias conhecidas de microRNAs e 1407 novas famílias foram identificadas. O estágio do ovo contribuiu para a maior quantidade de microRNAs. As famílias de miRNA conhecidas altamente expressas incluem miR-58, miR-1c, miR-124b, miR-71, miR-7062, miR-30e, miR-228, miR-100a, miR-6763 e let-7. Os dados também mostram que os miRNAs foram localizados em íntrons e regiões intergênicas (SUBRAMANIAN, 2016).

Tabela 2: Famílias miRNA conhecidas altamente expressas em *Meloidogyne incógnita*.

miRNA Family	Known miRNA ID	DESeq2 Normalized Values					Sequence (5' to 3')	Length	G + C Content
		Egg	J2	J3	J4	Female			
miR-58	MI03018	22.22	18.65	16.24	17.50	20.41	TGAGATCAGTCCAGATTTCGT	20	45
miR-1c	MI03171	21.33	19.73	16.15	13.96	17.46	TGGAATGTAAAGAAGTATGTAGA	23	30
miR-124b	MI02500	20.74	18.58	14.03	13.43	12.68	TAAGGCACGCGGTGAATGCTGA	22	55
miR-71	MI02950	20.52	20.71	19.54	18.75	20.06	TGAAAGACATGGGTAGTTGAGACC	24	46
miR-7062	MI03037	18.10	17.61	19.19	17.90	19.27	TGAGGACTGCTTGGAGTGCT	22	55
miR-30e	MI01618	11.70	11.11	16.21	17.52	19.57	CTTTGATCGGATGATTGT	19	37
miR-228	MI00377	19.36	17.84	16.91	15.93	17.17	AATGGCACCAATGAATTCACGG	23	43
miR-100a	MI00166	19.26	15.31	13.21	12.83	13.64	AACCCGTAGATCCGAAC TAGTCTT	24	46
miR-6763	MI03365	15.08	14.97	17.59	17.82	19.24	TGGGGAGTTTGGCTGGGGCG	20	70
let-7	MI03059	12.43	10.67	15.71	17.97	19.02	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT	22	36
miR-72	MI00819	18.48	16.32	12.11	12.84	13.18	AGGCAAGATTTGGCATTGCTGA	23	48
miR-425	MI01048	16.80	16.97	18.41	8.75	17.29	ATCGGGGGTGTCTGAATCTTT	21	48
miR-7904	MI02743	18.27	15.73	15.40	17.01	15.71	TCAAAAATTCGGTTGCGTCGCA	22	45
miR-3526	MI03614	15.16	16.76	17.44	18.13	17.35	TTGAAGACTGAAGTGGAGA	19	42
miR-716b	MI01916	15.46	16.44	17.46	17.54	17.11	GCAGATCTGGTGGTAGTACAAAT	25	44

Table shows highly expressed known miRNA across all stages. Read counts from the sequencing data were normalized to obtain DESeq2 values.

Fonte: SUBRAMANIAN, 2016.

Foi demonstrado que os miRNAs desempenham papéis críticos na sobrevivência e recuperação da pausa L1 induzida pela fome em nematóides de vida livre (ZHANG et al. 2011; AHMED et al., 2013) e que um *loop* de feedback envolvendo os membros do miRNA da família DAF-12 e *let-7* coordena as decisões sobre o destino celular com detenção induzida por fome (BETHKE et al. 2009; HAMMELL et al. 2009; KARP e AMBROS 2012; AHMED et al.,

2013). Até agora, a *mir-34* e *mir-71* foram atribuídos papéis na resposta à longevidade e ao estresse (IBÁÑEZ-VENTOSO et al. 2006; KATO et al. 2009; DE LENCASTRE et al. 2010; PINCUS et al. 2011; ZHANG et al. 2011; BOULIAS e HORVITZ, 2012; AHMED et al., 2013). Examinando a identidade sequencial dos miRNAs entre os nematoides de vida livre, necrófagos e os parasitas, identificou-se um pequeno conjunto de 24 famílias de miRNAs que são conservados entre as três espécies (AHMED et al., 2013).

Em um estudo feito por Liu et al. em 2019 foram identificados 45 miRNAs expressos no ovo e nos estágios de desenvolvimento J2 que compreendem 24 miRNAs conservados e 21 novos. 21 miRNAs foram expressos diferentemente entre os dois estágios de desenvolvimento diferentes, ovos e juvenis J2. Dois miRNAs foram regulados positivamente e 19 foram regulados negativamente no J2 em comparação com o estágio do ovo. Isso sugere que o mecanismo mediado por miRNA é o mesmo, independentemente das espécies vegetais infectadas por *M. incognita*. Os dois miRNAs mais comumente expressos altamente em ovos e J2s foram *mir-1* e *mir-92*, esse achado indica que esses dois miRNAs são fundamentais para o desenvolvimento de *M. incognita* durante a infecção. O *mir-1* é um miRNA específico do músculo que é altamente conservado entre vermes (helminthos) e vertebrados (cordatos), ele controla a formação das subunidades do receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) na junção neuromuscular, afetando assim a neurotransmissão colinérgica e o desenvolvimento muscular (SIMON et al., 2008; LIU et al., 2019).

O segundo miRNA mais expresso, *mir-92*, menos estudado em nematoides, é um importante regulador no desenvolvimento inicial do desenvolvimento do peixe-zebra e de *D. melanogaster*. Apesar de ser altamente expresso em *M. incognita*, o *mir-92* está ausente no genoma de nematoides de vida livre, como *C. elegans* (WANG et al., 2015; LIU et al., 2019) sugerindo que pode estar associado ao parasitismo. O *mir-279* conservado e relacionado à imunidade foi altamente expresso em ovos, mas foi regulado negativamente em juvenis J2, essa regulação negativa pode resultar em resposta imune reduzida. Os ovos externos ao hospedeiro podem estar sujeitos a um ambiente químico adverso; no entanto, os juvenis J2, tendo penetrado no hospedeiro, podem desligar as respostas imunes (LIU et al., 2019). A anotação do genoma de *M. incognita* também sugeriu redutores imunológicos reduzidos em *M. incognita*, em comparação com o nematoide de vida livre *C. elegans* (ABAD et al., 2008; LIU et al., 2019). Da mesma forma, o *mir-124*, expresso em abundância nos ovos e J2s, também regula a resposta imune. O *mir-124* é expresso em muitos neurônios sensoriais e é altamente conservado em nematoides de vida livre, parasitas e em vertebrados (CLARK et al., 2010; LIU et al., 2019). O



miRNA 124 regula muitos alvos genéticos no sistema nervoso sensorial e, portanto, é crítico para detectar sinais ambientais durante a infecção de plantas (ZHANG et al., 2016; LIU et al., 2019).

Os 16 miRNAs mais encontrados em ordem de abundância nos estudos de Zhong, Yangiong et al. Em 2016 em *M. incógnita* forma min-mir-100a, min-mir-124, min-mir-71a, min-mir-1, min-mir-228, min-mir-92, min-mir-72, min-mir-49b, min-mir-58, min-mir-252, min-mir-lin4, min-mir-87, min-mir-2a, min-mir-34a, min-mir-50a e min-mir-279a.

Os microRNAs *miR-71* e *miR-100* foram encontrados em abundância em *M. incógnita*, esse nível de expressão muito elevado indicou que estes miRNAs podem ser importantes para a vida de *M. incógnita*. Curiosamente, existem dois miRNAs, *mir-100* e *mir-92*, que foram altamente expressos em *M. incognita*, mas não foram em *C. elegans* (WANG, YUNSHENG et al., 2015). O miRNA mais expresso, *miR-71*, tem papéis importantes em que se prolonga o tempo de vida em *C. elegans* após remoção da linha germinativa (BOULIAS K, HORVITZ HR, 2012; WANG, YUNSHENG et al., 2015). O terceiro microRNA altamente expresso, *miR-124*, pode funcionar na célula neural (CAO X, PFAFF SL, GAGE FH, 2007; WANG, YUNSHENG et al., 2015). O quarto miRNA abundante é *miR-1* (WANG, YUNSHENG et al., 2015).

**CAPÍTULO ÚNICO****FULL TITLE**

Identification and characterization of miRNAs and RNA pathway components in nematode species

**RUNNING TITLE**

miRNAs and components of RNA pathway in nematode species

**AUTHORS**

A.L.F. Camargos<sup>1</sup>, C. Araújo<sup>1</sup> and M. de Souza Gomes<sup>1</sup>

**AFFILIATIONS**

Laboratory of Bioinformatics and Molecular Analysis (LBAM), Federal University of Uberlandia (UFU) - Campus Patos de Minas, Patos de Minas, Minas Gerais, Brazil.

**CORRESPONDING AUTHOR**

Matheus de Souza Gomes

matheusgomes@ufu.br

## Abstract

Plant-parasitic nematodes are highly damaging pathogens that can infect and cause severe damage to plants, including death. They are responsible for significant economic losses in global agriculture and are found in major crops of economic importance. While various methods are used to control plant-parasitic nematodes, their efficiency is limited. One promising approach is the use of gene silencing techniques. However, successful implementation of this method requires a thorough understanding of microRNAs and their processing pathways in plant-parasitic nematodes. This study aimed to identify and characterize the genes involved in the miRNA pathway in *Meloidogyne* species, including *M. arenaria*, *M. enterolobii*, *M. floridensis*, *M. graminicola*, *M. hapla*, *M. incognita*, and *M. javanica*, using *in silico* analysis. A total of 115 proteins involved in the microRNA pathway were identified, and key pathway proteins, such as RNases III and Argonaute were characterized. The conserved domains, active sites, and phylogenetic relationships of these proteins were analyzed to confirm their functional activities in cells. Additionally, putative precursors and mature microRNAs were identified in the genomes of *M. enterolobii* and *M. arenaria*. The analysis revealed 86 putative microRNA sequences in *M. enterolobii*, 96 in the first genome of *M. arenaria*, 41 in the second genome, and 45 in the third genome. The mir-87 microRNA family was analyzed for *M. enterolobii* and *M. arenaria*. The sequence conservation and phylogenetic distribution of each family suggested the presence of miRNAs in all nematode genomes. Overall, these results provide a better understanding of miRNAs' essential roles in miRNA-based regulatory processes in plant-parasitic nematodes and their potential as targets for gene silencing techniques for controlling this pest.

Keywords: Nematodes; Phytonematodes; miRNA.

## INTRODUCTION

Nematodes are the most abundant multicellular animals on Earth, considering the number of individuals (Lorenzen 1994). They have a cosmopolitan geographic distribution (Barnes et al. 1993). Belonging to the phylum Nematoda, they are invertebrates with threadlike bodies (De Ley and Blaxter 2004). They have a long evolutionary history leading to the current diversity in their way of life and can be predators, herbivores, and parasites (Mitreva et al. 2005).

Commonly called phytonematodes, about 4,100 species of nematodes are capable of parasitizing plants (Decraemer and Hunt 2006). Phytonematodes cause significant economic losses in important crops of economic importance or subsistence, causing qualitative and quantitative losses in agriculture. The average annual reduction in world agricultural production caused by plant nematodes is estimated at 12%, which corresponds to billions of dollars in damage, and this number is probably an underestimate (Saitou and Nei 1987).

The nematode genus *Meloidogyne* is considered the most important among plant parasites (Saitou and Nei 1987; Rich et al. 2009), mainly due to its wide host range. They are known to parasitize over 3,000 species of wild and cultivated plants (Hussey and Janssen 2002; Rich et al. 2009). Among this genus, *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita*, and *M. javanica* account for 95% of all infestations on agricultural land (Hussey and Janssen 2002; Rich et al. 2009). Field infestations by species of the genus *Meloidogyne* result in significant economic damage (Danchin et al. 2013; Bebber et al. 2014; Susič et al. 2020), mainly due to the occurrence of dwarfism, loss of vigor, and wilting, leading to annual losses global estimates of US\$110 billion (Danchin et al. 2013; Bebber et al. 2014; Susič et al. 2020).

Phytonematodes are difficult to control because some, such as those of the genus *Meloidogyne*, cannot be controlled by varietal resistance and crop rotation (Haque and Gowen

1989; Carneiro 1992); and the nematicides available, in general, do not present an effective control compared to the cost of treatment, in addition to their high toxicity (Haque and Gowen 1989; Carneiro 1992). Recently, the strategy of gene silencing, or interference mediated by double-stranded RNA (dsRNA), has shown promise for the control of nematodes (McCarter\* 2008).

MicroRNAs (miRNAs) are a class of small, endogenous, single-stranded, non-coding RNAs (Bartel 2009) that have a mature form of 18 to 25 nucleotides and regulate post-transcriptional and transcriptional gene expression (Dasgupt and Chatterjee 2021). They play a critical role in post-transcriptional gene regulation (He and Hannon 2004; Dasgupt and Chatterjee 2021). miRNAs serve as modulators of gene expression by annealing complementary sequences in the 3' or 5' untranslated regions (3'UTR or 5'UTR) of target mRNAs to block the translation machinery and direct mRNA cleavage (Olsen and Ambros 1999; Lai 2002; Lim et al. 2005; Hammond 2015; Dasgupt and Chatterjee 2021). Both cleavage and repression mechanisms of translation require base pair complementarity between the miRNA and its targeted messenger RNA (mRNA) (Voinnet 2009).

Since the discovery of the first miRNA gene, *lin-4*, studies with model organisms such as *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, and *Arabidopsis thaliana* have identified the biological function of various miRNAs (Ambros 2004; Ying and Lin 2004). These RNAs function as regulators of various eukaryotic processes, such as cell proliferation, differentiation, development and death, virus-host cell interaction, metabolism, chromosome conformation, oncogenesis, and so on (Schwarz et al. 2003; O'Donnell et al. 2005; Cai et al. 2006; Iorio et al. 2007).

This study aims to identify and characterize putative proteins involved in the miRNA pathway using in silico analysis through predicted nematode proteome data, using conserved domain analysis, active site residue analysis, and phylogenetic analysis. Furthermore, the study

seeks to characterize and analyze the conservation of putative miRNAs and their precursors in nematodes using data from nematode genomes and the conservation of primary and secondary structures and phylogenetic analysis.

## MATERIAL AND METHODS

### Prediction of putative proteins involved in miRNA biogenesis

We have used predicted proteome sequences of selected nematode species of the genus *Meloidogyne* (*Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne enterolobii*, *Meloidogyne floridensis*, *Meloidogyne graminicola*, *Meloidogyne hapla*, *Meloidogyne incognita*, and *Meloidogyne javanica*) available on NCBI public databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and WormBase (<https://wormbase.org/>). To obtain the predicted proteins involved in the biogenesis of miRNAs, *C. elegans* reference sequences were used as queries using the BLASTp software (NCBI 2023). A set of homologous proteins were retrieved from the NCBI reference protein database using Blastp. An algorithm was applied to make searching faster and more accurate.

### Prediction of mature miRNAs and their precursors (pre-miRNAs)

The search for putative miRNAs and their precursors was carried out using an optimized algorithm developed in several steps based on the conserved characteristics of these molecules (de Souza Gomes et al. 2011). Firstly, genome and transcriptome sequences with the potential formation of hairpin structures or similar structures of miRNA precursors were obtained. The Blastn program and the Einverted program (EMBOSS tool) were used (NCBI 2023). These sequences were fed into a series of filters to eliminate undesirable sequences, allowing only those corresponding to probable miRNAs to remain. These filters inserted in the algorithm were based on conserved features of miRNA precursors and features of other known regions that do not have the potential to form miRNA precursors. The filters used were GC content (guanine and cytosine), minimum free energy (MFE), homology with mature miRNAs, homology with

protein-coding regions, homology with repetitive regions, and homology with non-coding RNAs. A miRNA classifier was also used, which is based on the previous characteristics of putative real miRNAs, pseudo-miRNAs, and non-real miRNAs along with information from machine learning technology, “random forest” (Jiang et al. 2007). The prediction of secondary structures of pre-miRNAs was carried out using RNAfold (UV 2023) with default parameters (Zuker and Stiegler 1981).

Comparison at the primary and secondary level of the compared putative miRNA precursor sequences was performed using RNAalifold ("<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAalifold.cgi>") (UV 2023). Additionally, the predicted miRNAs were compared to the set of miRNAs found in other organisms.

#### Sequence alignment, conserved domains, and phylogenetic analysis

The miRNA precursor sequences and protein amino acid sequences were aligned using the ClustalX 2.0 tool (Thompson et al. 2003; UV 2023; UV 2023) via multiple sequence alignment. For the miRNA precursor sequences, the alignment parameters were adjusted due to the complexity and size of the initial material. Conserved domains and active sites were obtained separately from predicted proteins and their homologs to analyze the presence of essential amino acid residues for their respective proteins via multiple alignments. The PFAM protein family database (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) and the conserved domains database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) were used for the analysis of conserved protein domains and protein active sites, respectively (Mistry et al. 2021).

Phylogenetic analysis was performed using the Neighbor-joining method for both sequence groups (Saitou and Nei 1987). A consensus tree was inferred using "bootstrap" for 2000 replicates representing the evolutionary history of the sequences studied. The evolutionary



distance for putative pre-miRNAs was computed using Kimura-2-parameters in base units substituted per site, while the JTT model was used for putative proteins. The phylogenetic analysis was conducted in MegaX software (Tamura et al. 2007).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Prediction of putative proteins involved in miRNA biogenesis

Proteins involved in the biogenesis of miRNAs were predicted in seven different species of the genus *Meloidogyne*, namely *M. arenaria*, *M. enterolobii*, *M. floridensis*, *M. graminicola*, *M. hapla*, *M. incognita*, and *M. javanica*, which have predicted genomes and proteomes available in the WormBase database (<https://wormbase.org>). Genes and proteins involved in the miRNA pathway were chosen based on bibliographical research in scientific articles. The BLASTp software from the WormBase database (<https://parasite.wormbase.org/Multi/Tools/Blast>) was used to obtain predicted proteins using reference protein sequences from *C. elegans* and *D. melanogaster* involved in miRNA biogenesis, found in the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). In total, 115 proteins involved in the pathway were analyzed and are listed in supplementary table S1. The reciprocal was performed using the NCBI BLASTp program (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A set of homologous proteins for each of the surveyed species was obtained and are available in supplementary tables S2, S3, S4, S5, S6, S7, and S8.

To carry out their functions, miRNAs must be incorporated into complexes with Argonaute-like proteins, which are small highly specialized RNA-binding modules and major components of RNA silencing pathways (Bohmert et al. 1998). They are conserved across species, and many organisms express multiple members of the family, ranging from one in *Schizosaccharomyces pombe*, five in *Drosophila*, eight in humans, ten in *Arabidopsis*, to twenty-seven in *C. elegans* (Tolia and Joshua-Tor 2007).

After analysis, four homologous Argonaute-like proteins were identified in *M. arenaria*, which were the Argonaute-like proteins of *C. elegans* and orthologous to the Argonaute-like

proteins of *D. melanogaster* (M.Arenaria\_Scaff3565g042373, M.Arenaria\_Scaff4844g050589, M.Arenaria\_Scaff3971g045158 and M.Arenaria\_Scaff776g014991); two homologous Argonaute-like proteins of *C. elegans* and *D. melanogaster* (scaffold2053\_cov192.g3461 and scaffold11735\_cov194.g14964) were identified in *M. enterolobii*; one homologous Argonaute-like proteins of *D. melanogaster* and *C. elegans* in *M. floridensis* (scf7180000423291.g10608); a homologous argonaute of *C. elegans* and *D. melanogaster* was identified (MhA1\_Contig2.frz3.gene25) in *M. hapla*; two homologous Argonaute-like proteins of *C. elegans* and *D. melanogaster* (Minc3s00730g16613 and Minc3s00960g19312) were identified in *M. incognita*; and four orthologous Argonaute-like proteins of *C. elegans* and *D. melanogaster* (M.Javanica\_Scaff52g001103, M.Javanica\_Scaff1073g012540, M.Javanica\_Scaff2303g022037, and M.Javanica\_Scaff18988g079886) have been identified as important components of microRNA (miRNA) biogenesis in *M. javanica*, a plant-parasitic nematode.

Another protein critical for miRNA biogenesis is Dicer ribonuclease, which converts long dsRNAs into small interfering RNAs (siRNAs) of approximately 22 nucleotides (nt) containing 2 nt 3' overhangs (Bernstein et al., 2001; Gregory 2005). While most species, such as *C. elegans* and humans, contain a single Dicer enzyme, two Dicers, Dicer-1, and Dicer-2, have been found in *Drosophila* (Bernstein et al. 2001; Jiang et al. 2005). Genetic studies have suggested that Dicer-1 and Dicer-2 are involved in miRNA and siRNA production, respectively (Lee et al. 2004b; Jiang et al. 2005). In *M. arenaria*, four Dicer-1 homologs to those of *C. elegans* and *D. melanogaster* have been identified (M.Arenaria\_Scaff8816g068601, M.Arenaria\_Scaff2306g032054, M.Arenaria\_Scaff6559g059360, and M.Arenaria\_Scaff731g014334), along with two Dicer homologs to those of *C. elegans* and *D. melanogaster* (scaffold6107\_cov164.g9058 and scaffold7310\_cov168.g10562) in *M. enterolobii*. In *M. floridensis*, one Dicer homolog to that of *C. elegans* and *D. melanogaster*

(scf7180000423569.g11302), in *M. graminicola* one homolog to that of *C. elegans* and *D. melanogaster* (NXFT01000985.1.2590\_g), in *M. hapla* one homolog to that of *C. elegans* and *D. melanogaster* (MhA1\_Contig1137.frz3.fgene2), and *M. incognita*, two homologs to those of *C. elegans* and *D. melanogaster* (Minc3s00995g19690 and Minc3s00007g00452) in the plant parasitic nematode *M. incognita* were found to have five homologous dicers to those found in *C. elegans* and *D. melanogaster* (M.Javanica\_Scaff587g007894, M.Javanica\_Scaff16566g074861, M.Javanica\_Scaff2511g023435, M.Javanica\_Scaff4422g034530, and M.Javanica\_Scaff2524g023521).

In the biogenesis of miRNAs, the initial processing of pri-miRNAs occurs in the nucleus and is catalyzed by a member of the ribonuclease III (RNase III) family called Drosha (Lee et al. 2003; Lee et al. 2006). The pri-miRNAs, which are transcribed as long primary molecules by RNA polymerase II (Han et al. 2004; Lee et al. 2004a), are cut into hairpin pre-miRNAs by the nuclear RNase III Drosha (Lee et al. 2003; Han et al. 2004). This processing step is critical in miRNA biogenesis (Lee et al. 2003; Lee et al. 2004a; Lund et al. 2004). Drosha is conserved only in animals (Filippov et al. 2000; Wu et al. 2000; Fortin et al. 2002; Lee et al. 2006).

The presence of homologs to the Drosha protein in different nematode species was investigated in this study. Specifically, three homologs of Drosha from *C. elegans* and *D. melanogaster*, namely M.Arenaria\_Scaff7632g064098, M.Arenaria\_Scaff2471g033533, and M.Arenaria\_Scaff14103g083648, were identified in *M. arenaria*. Additionally, two homologs to the Drosha protein from *C. elegans* and *D. melanogaster*, scaffold1486\_cov231.g2488 and scaffold41068\_cov207.g25210, were found in *M. enterolobii*. One homolog of Drosha from *C. elegans* and *D. melanogaster* was identified in each of the following species: *M. floridensis* (scf7180000424706.g13770), *M. graminicola* (NXFT01003141.1.8187\_g), *M. hapla* (MhA1\_Contig520.frz3.gene17), and *M. javanica* (M.Javanica\_Scaff5488g039684). Two

homologs to the Drosha protein from *C. elegans* and *D. melanogaster*, namely Minc3s01705g25748 and Minc3s03535g34126, were identified in *M. incognita*.

In addition to the analysis of the Drosha protein homologs, other proteins involved in the miRNA processing pathway were investigated for their presence in the seven *Meloidogyne* species studied. These proteins are listed in supplementary tables S2, S3, S4, S5, S6, S7, and S8. The presence of these predicted proteins suggests the presence of the miRNA pathway in these nematodes. It is therefore probable that a post-transcriptional gene regulation mechanism dependent on RNA interference mechanisms is present in *M. arenaria*, *M. enterolobii*, *M. graminicola*, *M. floridensis*, *M. hapla*, *M. incognita*, *M. javanica*.

#### Conserved domains

The conserved domains of the identified proteins in the initial stage of the study for each *Meloidogyne* species (*M. arenaria*, *M. enterolobii*, *M. graminicola*, *M. floridensis*, *M. hapla*, *M. incognita*, and *M. javanica*) were analyzed using the PFAM protein family database (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) (Mistry et al. 2021). The obtained results are presented in supplementary tables S9, S10, S11, S12, S13, S14, and S15.

Krishnatreya et al. (2021) and various other studies have reported that the Argonaute family of proteins comprises six conserved domains, namely the N-terminal domain (Argo-N), PAZ domain, MID domain, PIWI domain, and two linker domains (Argo-L1 and Argo-L2). The functional domains of AGO proteins, primarily the PAZ, MID, and PIWI domains, define their characteristics (Wang et al. 2008; Wang et al. 2009; Mallory and Vaucheret 2010; Parker 2010). Therefore, argonaute proteins lacking these conserved domains may not be complete.

Dicers also possess six conserved domains, which include the DEAD-box helicase, C-terminal helicase domain, Dicer dimerization domain, PAZ, Ribonuclease-III, and dsRNA

binding motif. However, certain Dicers lack some of these domains, such as the *Giardia intestinalis* Dicer that lacks the helicase, DUF283, and dsRBD domains (MacRae et al. 2006; Ciechanowska et al. 2021), or the *A. thaliana* DICER-LIKE 3 (DCL3) protein that lacks the DUF283 domain (Johanson et al. 2013; Ciechanowska et al. 2021), or the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* DCL3, which lacks the PAZ domain (Valli et al. 2016; Ciechanowska et al. 2021). This can occur in Dicers proteins of the analyzed species that did not have some conserved domains found. Drosha proteins have two conserved ribonucleases III domains in tandem and a double-stranded RNA binding domain (dsRBD) (Lee et al. 2006).

In the species, *M. arenaria* (Figure 1) three out of the homologs Argonaute-like proteins to the Argonaute-like proteins of *D. melanogaster* and *C. elegans* (M.Arenaria\_Scaff3565g042373, M.Arenaria\_Scaff3971g045158, and M.Arenaria\_Scaff776g014991) have all six expected conserved domains (PIWI, ArgoMID, PAZ, ArgoN, ArgoL1, and ArgoL2). One (M.Arenaria\_Scaff4844g050589) has four of the expected conserved domains (PIWI, ArgoMid, PAZ, and Linker2). Three Dicers (M.Arenaria\_Scaff2306g032054, M.Arenaria\_Scaff6559g059360, and M.Arenaria\_Scaff731g014334) have the conserved domains Ribonuclease 3, PAZ, Dicer dimer, Helicase C and ResIII; one Dicer (M.Arenaria\_Scaff8816g068601) has only the Ribonuclease 3 domain.

The green alga *Chlamydomonas reinhardtii* DCL3 lacks the PAZ domain, as has been reported in previous studies (Valli et al., 2016; Ciechanowska et al., 2021). This may be due to the absence of conserved domains in the Dicer proteins of this species. Drosha proteins, on the other hand, possess two conserved ribonuclease III domains arranged in tandem and a double-stranded RNA binding domain (dsRBD), as previously described (Lee et al., 2006).



Figure 1. Conserved domains of Argonaute-like proteins, Dicers, and Droschas proteins from *M. arenaria*.

In *M. enterolobii* (Figure 2), all homologs of Argonaute-like proteins, namely scaffold2053\_cov192.g3461 and scaffold11735\_cov194.g14964, which are analogous to those found in *C. elegans* and *D. melanogaster*, possess the expected six conserved domains, which include PIWI, ArgoMID, PAZ, ArgoN, ArgoL1, and ArgoL2.

One Dicer homolog in *M. enterolobii*, scaffold6107\_cov164.g9058, shares conserved domains with the Dicer protein found in *C. elegans* and *D. melanogaster*, including Ribonuclease III, PAZ, Dicer Dimerization, C-terminal Helicase, and ResIII. Another homolog, scaffold7310\_cov168.g10562, possesses the conserved domains Ribonuclease III, PAZ, Dicer dimerization, DEAD-box, and C-terminal helicase.

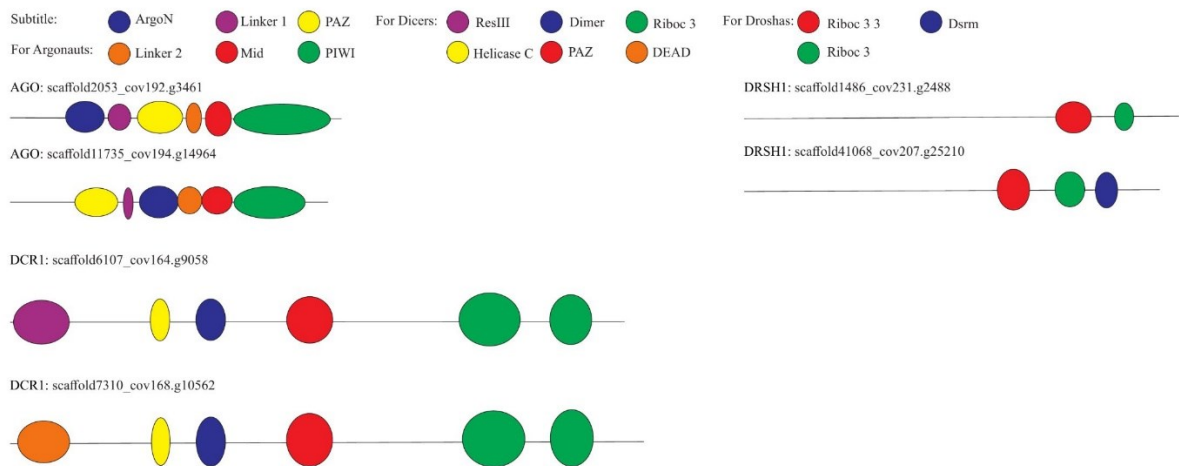


Figure 2. Conserved domains of the Argonaute-like proteins, Dicers, and Droshas proteins from *M. enterolobii*.

In the species *M. floridensis* (Figure 3), only one homolog of argonaute proteins analogous to those found in *D. melanogaster* and *C. elegans* was found, scf7180000423291.g10608, has conserved domains that include PIWI, MID, ArgoN, L1, and L2, lacking just the PAZ domain to have all six expected domains.

The identified homologs Dicer in *M. floridensis* possess a conserved C-terminal domain, namely scf7180000423569.g11302.

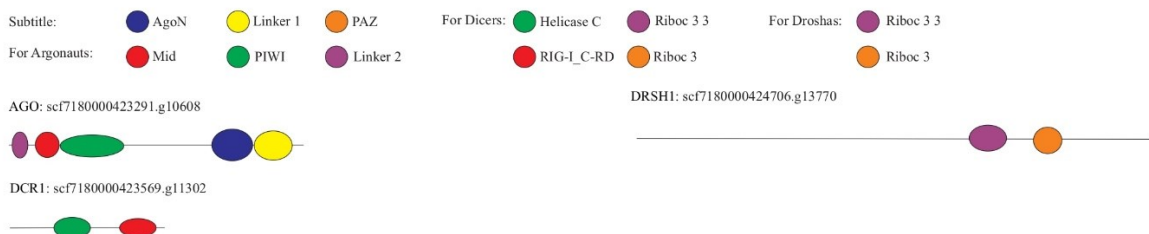


Figure 3. Conserved domains of Argonaute-like proteins, Dicers, and Droshas proteins from *M. floridensis*.



In *M. graminicola*, proteins homologous to argonautes analogous to those found in *D. melanogaster* and *C. elegans* were not found. The identified homologs Dicer protein (NXFT01000985.1.2590\_g) has two conserved Ribonuclease III domains, PAZ domain, Dicer Dimerization domain, C-terminal Helicase, and ResIII.

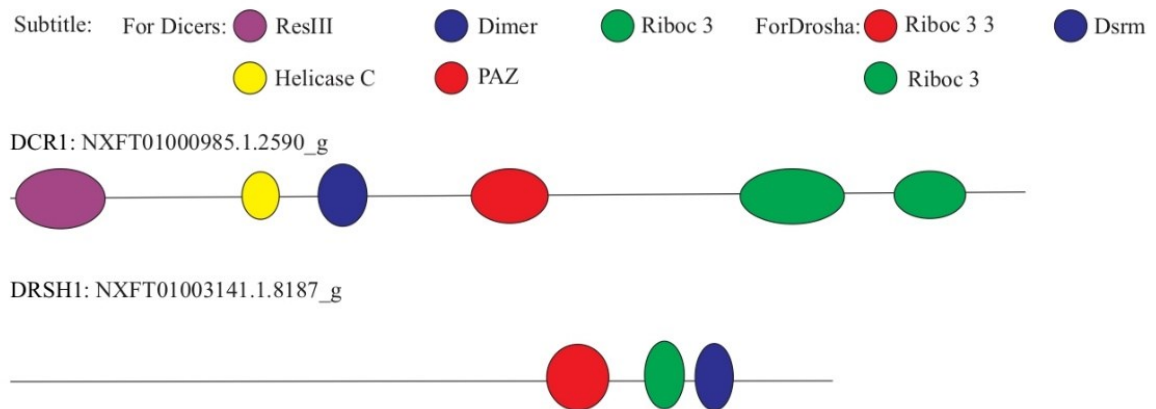


Figure 4. Conserved domains of Argonaute-like proteins, Dicers, and Droshas proteins from *M. graminicola*.

In the species *M. hapla* (Figure 5), the identified homologue of the Argonauta protein has the expected six conserved domains (PIWI, ArgoMID, PAZ, ArgoN, ArgoL1, and ArgoL2). As for the Dicer protein, the identified homologue contains the conserved domains ribonuclease III, PAZ, Dicer dimerization domain and helicase C.

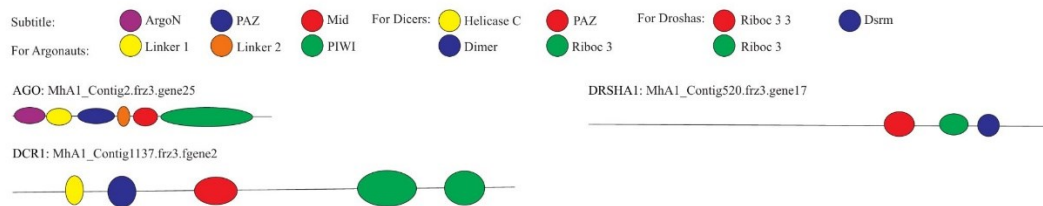


Figure 5. Conserved domains of Argonaute-like proteins, Dicers, and Droshas proteins from *M. hapla*.

In the species *M. incognita* (Figure 6), both identified homologs of Argonaute-like proteins (Minc3s00730g16613 and Minc3s00960g19312) possess the expected six conserved domains (PIWI, ArgoMID, PAZ, ArgoN, ArgoL1, and ArgoL2). As for the Dicer protein, one homolog (Minc3s00995g19690) contains the conserved Ribonuclease III, PAZ, Dicer Dimerization, C-terminal Helicase, and ResIII domains, while the other (Minc3s00007g00452) has a DEAD-box domain instead of ResIII.

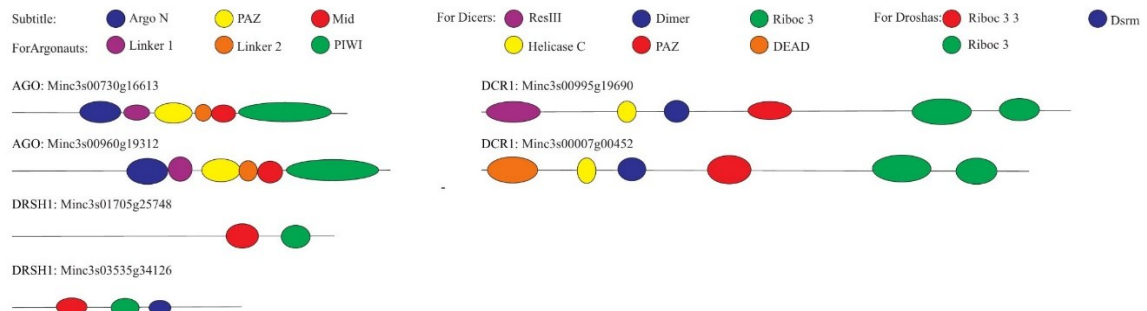


Figure 6. Conserved domains of Argonaute-like proteins, Dicers, and Droshas proteins from *M. incognita*.

In *M. javanica* (Figure 7), two homologous proteins identified as Argonaute-like proteins (M.Javanica\_Scaff52g001103 and M.Javanica\_Scaff2303g022037) possess the expected six domains (PIWI, ArgoMID, PAZ, ArgoN, ArgoL1, and ArgoL2). One (M.Javanica\_Scaff1073g012540) lacks the L1 domain, while the other

(M.Javanica\_Scaff18988g079886) has two PIWI domains and an ArgoMID. Among the identified homologs of Dicers from *C. elegans* and *D. melanogaster*, one (M.Javanica\_Scaff587g007894) has the conserved Ribonuclease III, PAZ, Dicer Dimerization, C-terminal Helicase, and ResIII domains, two (M.Javanica\_Scaff16566g074861 and M.Javanica\_Scaff2524g023521) possess only one Ribonuclease III domain, one (M.Javanica\_Scaff2511g023435) has two PAZ domains, two Dicer Dimerization domains, two Ribonuclease III domains, and two C-terminal Helicase domains, and the other (M.Javanica\_Scaff4422g034530) has one PAZ domain, a Dicer Dimerization domain, and two Ribonuclease III domains.

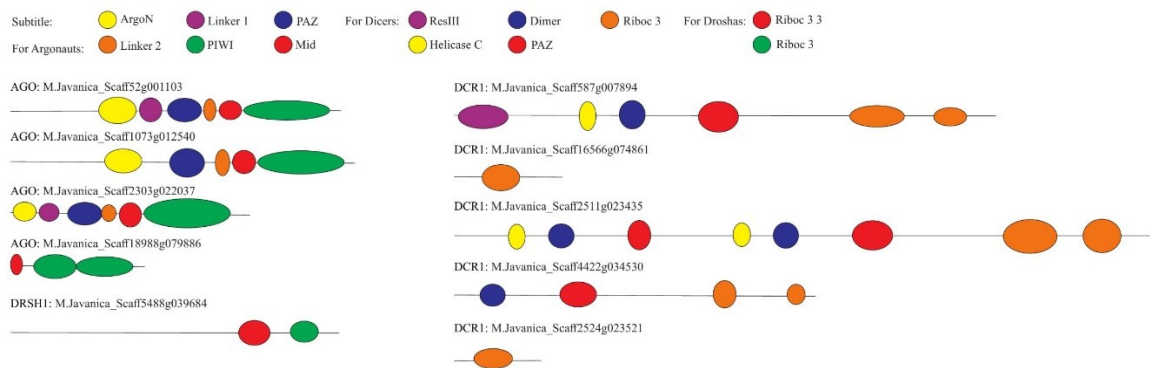


Figure 7. Conserved domains of Argonaute-like proteins, Dicers, and Droshas proteins from *M. javanica*.

Regarding the Drosha protein, all identified homologs in the studied species exhibit both Ribonuclease III domains, as expected. Some of them also possess the double-stranded RNA-binding domain (Figures Figure 1, Figure 2, Figure 3, Figure 4, Figure 5, Figure 6 and Figure 7). Furthermore, additional pathway proteins were examined for the presence of conserved domains in the seven *Meloidogyne* species investigated and are provided in supplementary tables S9, S10, S11, S12, S13, S14, and S15.

## Active Sites

For active site analysis, the Conserved Domains Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) (NCBI 2023) and the ClustalX 2.0 tool were utilized to completely align the analyzed proteins. Key proteins involved in the miRNA silencing pathway, namely, Argonaute-like proteins, Dicer, and Drosha, were selected for active site analysis. These three proteins were evaluated in each *Meloidogyne* species studied, including *M. arenaria*, *M. enterolobii*, *M. graminicola*, *M. floridensis*, *M. hapla*, *M. incognita*, and *M. javanica*. The results of the analysis are presented in supplementary tables S16, S17, and S18.

In Argonaute-like proteins, the PIWI domain contains a catalytic site responsible for cleaving the target messenger RNA (mRNA). This active site comprises three amino acid residues: DDH (aspartate, aspartate, and histidine) or DDD (Mallory and Vaucheret 2010; Cardoso et al. 2020). In Dicer proteins, the active sites are present in two RNase III domains, which show a distribution of the following amino acids: glutamic acid (E), aspartate (D), aspartate (D), and glutamic acid (E), forming the EDDE site. The same EDDE site is present in Drosha proteins (Gomes et al. 2009; Cardoso et al. 2020).

In the studied Argonaute-like proteins, most of them have the expected DDH active site. However, proteins from *M. enterolobii* scaffold11735\_cov194.g14964 and sc7180000423291.g10608 from *M. floridensis* did not show 100% conservation, as shown in their active sites in Figure 8.

The catalytic amino acid core is a key factor that contributes to the cleaving efficiency of the PIWI domain, although other properties may also play a role. The crystal structure of the

*Thermus thermophilus* AGO protein (Wang et al. 2009; Mallory and Vaucheret 2010) has revealed one such property.

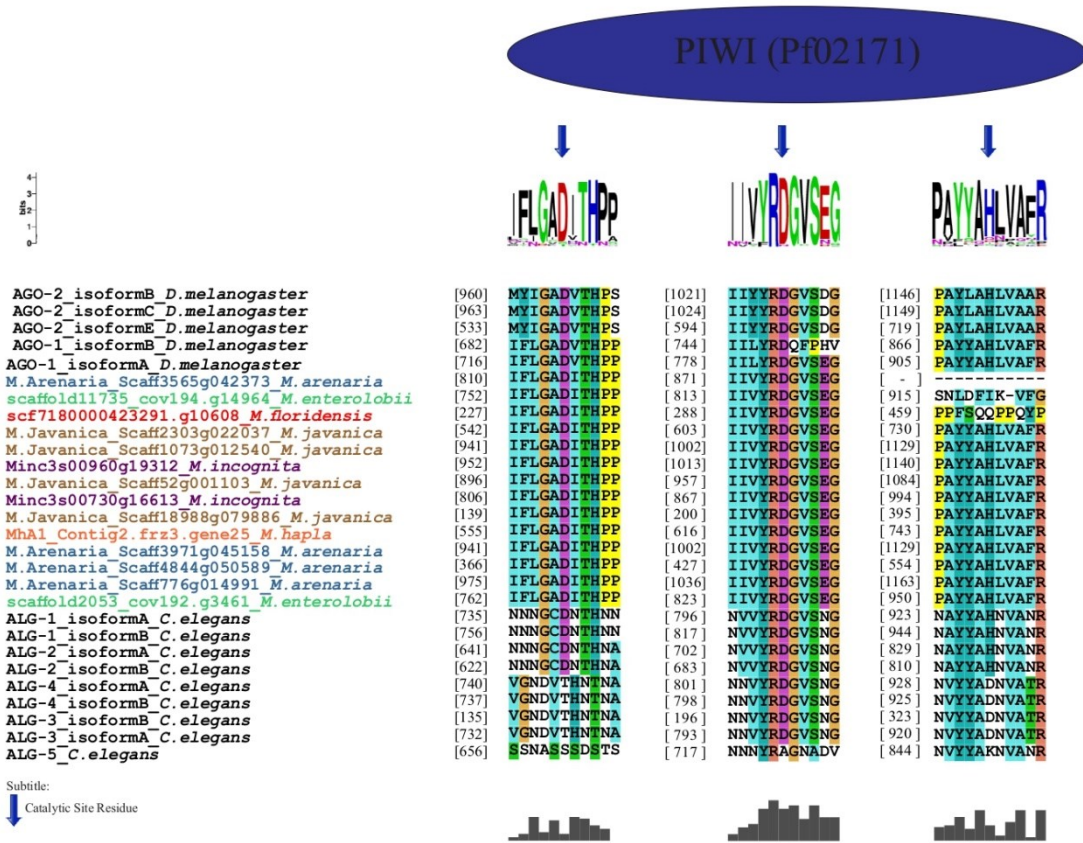


Figure 8. Analysis of conserved domains and active sites of Argonaute-like proteins de *D. melanogaster*, *C. elegans*, *M. arenaria*, *M. javanica*, *M. enterolobii*, *M. floridensis*, *M. incognita*, *M. hapla*, and *M. graminicola*.

All Dicer 1 proteins studied in Figure 8 demonstrated the expected highly conserved active site with the amino acid sequence EDDE (glutamic acid, aspartate, aspartate, glutamic acid). However, in the case of *M. floridensis*, no protein was found by the homology method that could be compared to the others, as shown in Figure 9.

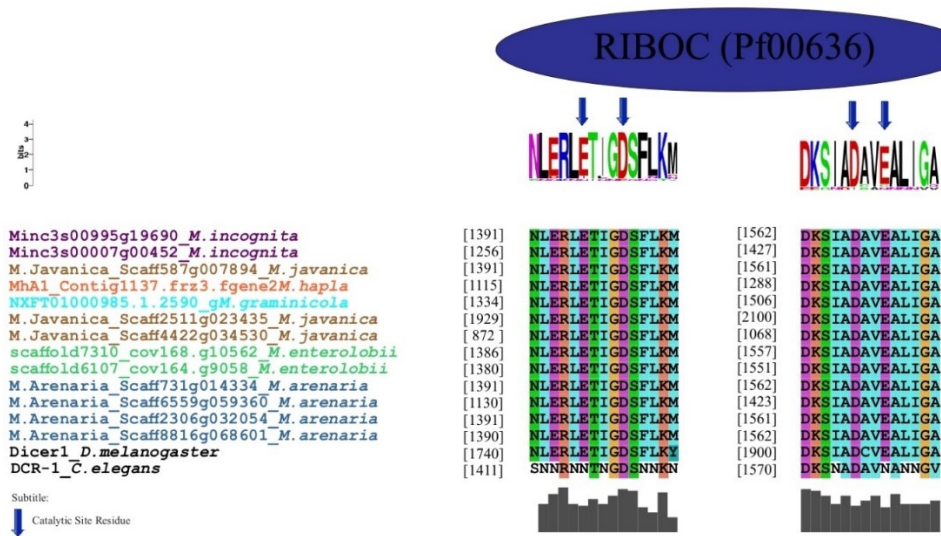


Figure 9. Analysis of conserved domains and active sites of Dicers from *D. melanogaster*, *C. elegans*, *M. arenaria*, *M. javanica*, *M. enterolobii*, *M. incognita*, *M. hapla*, and *M. graminicola*.

In the case of Drosha proteins, it was expected that they would have the same active site as Dicer 1, EDDE. However, most Drosha proteins had the amino acid sequence EDNE (glutamic acid, aspartate, asparagine, glutamic acid) as an active site. This sequence was also present in Drosha from *D. melanogaster*, which was one of the species used as a reference in this study, as shown in Figure 10.

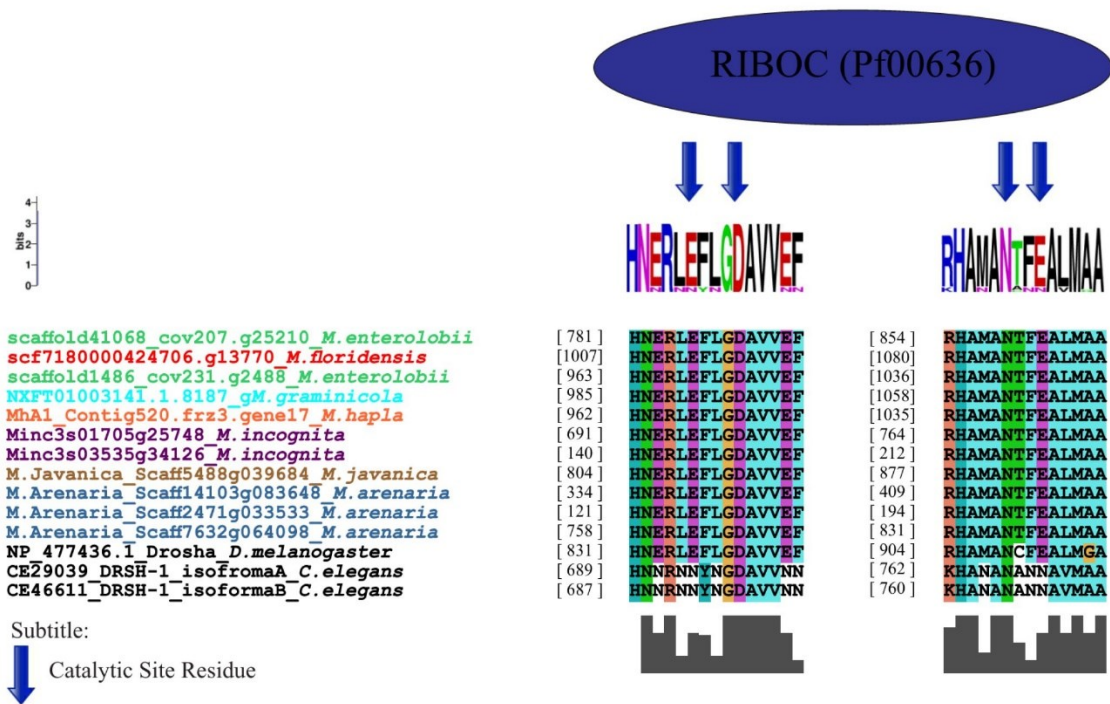


Figure 10. Analysis of conserved domains and active sites of Drosha from *D. melanogaster*, *C. elegans*, *M. arenaria*, *M. javanica*, *M. enterolobii*, *M. floridensis*, *M. incognita*, *M. hapla*, and *M. graminicola*.

### Phylogenetic analysis of proteins

To increase the reliability of identifying proteins in the *Meloidogyne* species under investigation and to assess their phylogenetic relationships with homologous proteins, we conducted a phylogenetic analysis using their amino acid sequences. We used this method to determine the evolutionary history of proteins from the Argonaute family (Figure 11), the Dicer family (Figure 12), and the Drosha family (Figure 13) in the studied species. Our results revealed that the phylogeny of these proteins followed the well-defined clades of the tree of life, indicating their evolutionary relationships.

However, the analysis showed that the species *M. floridensis* did not have a compatible dicer protein, despite undergoing the same protocols as the other species. This suggests that

either the protein is absent in this species or that the protocols used were not sufficient to detect it. These findings highlight the importance of using a rigorous and comprehensive approach when conducting phylogenetic analyses of proteins.



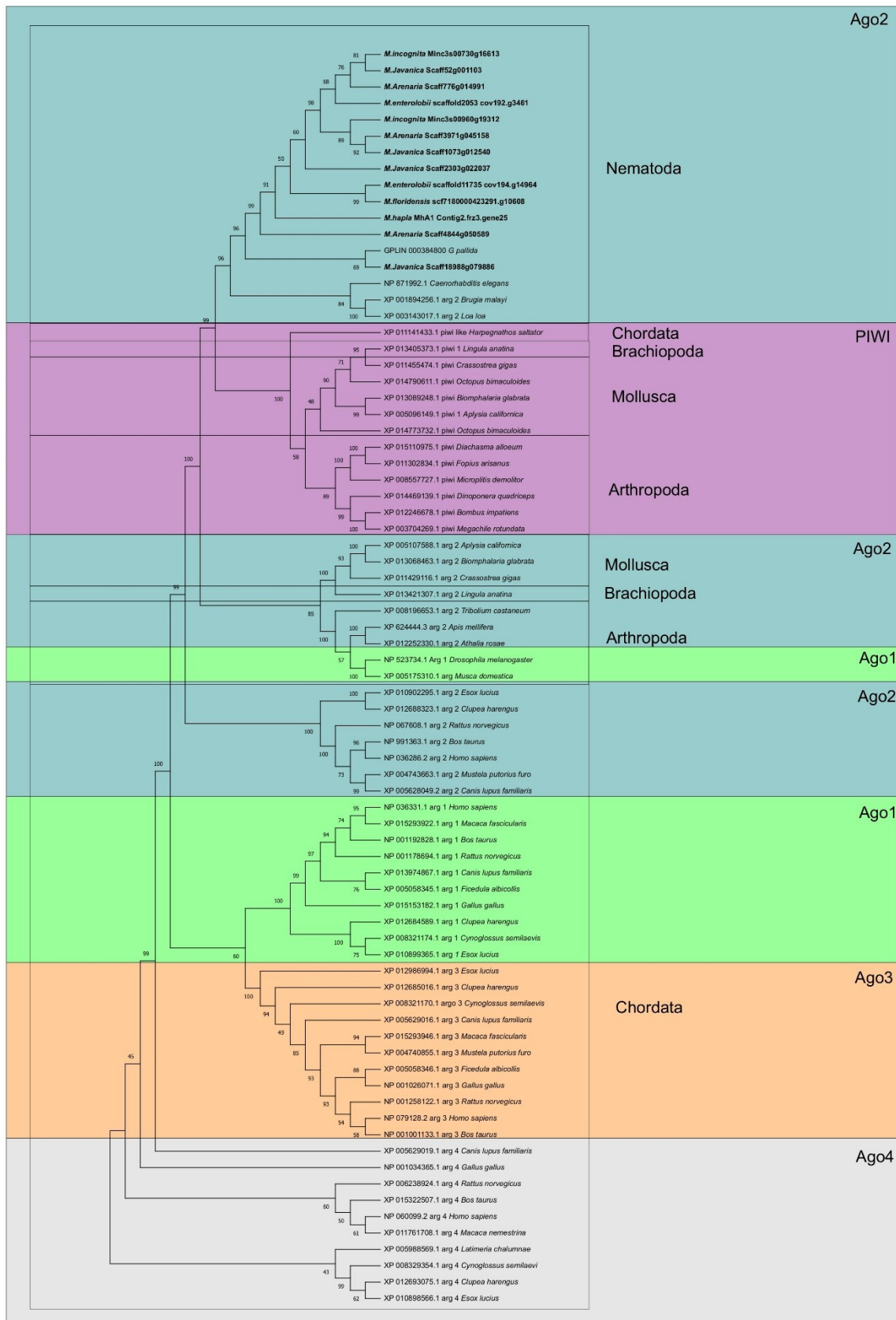


Figure 11. Argonaute’s Phylogenetic Tree. The phylogeny of these proteins followed the well-defined clades of the tree of life, indicating their evolutionary relationships.

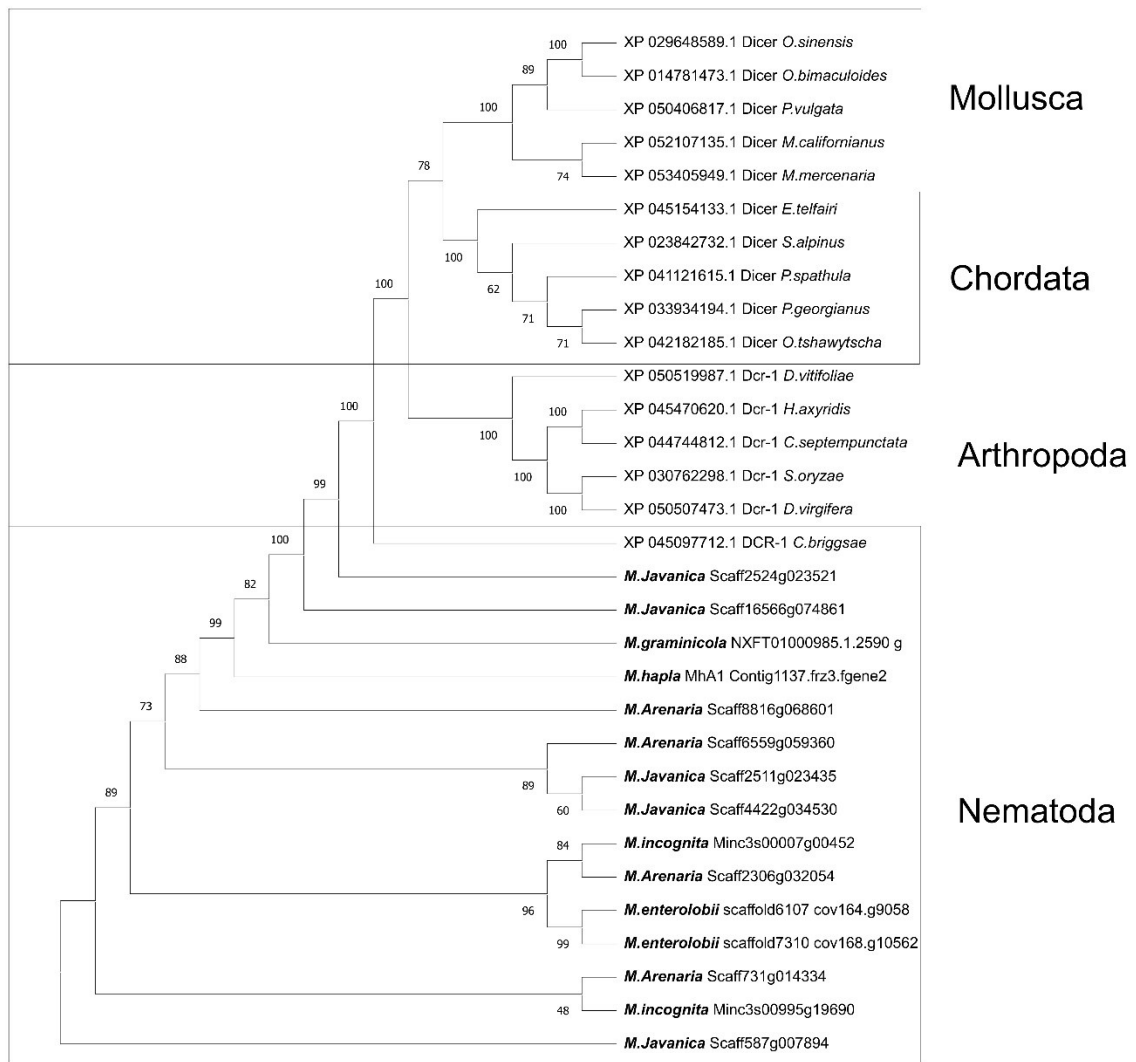


Figure 12. Dicer's phylogenetic tree. The phylogeny of these proteins followed the well-defined clades of the tree of life, indicating their evolutionary relationships.

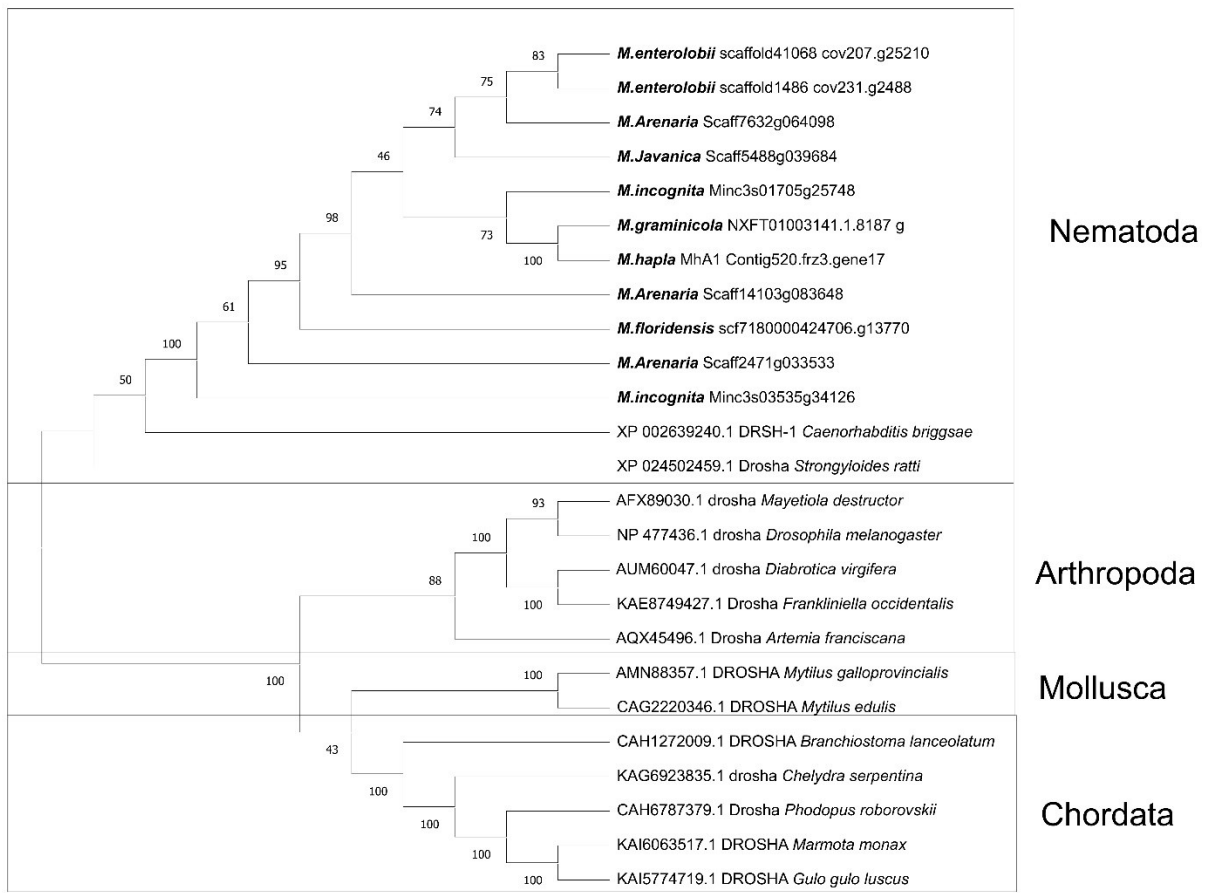


Figure 13. Droscha's phylogenetic tree. The phylogeny of these proteins followed the well-defined clades of the tree of life, indicating their evolutionary relationships.

### Mature miRNAs and their precursors

To demonstrate the conservation of miRNA processing machinery and mature sequences in phytonematode species of the genus *Meloidogyne*, we aimed to identify mature miRNA sequences and their precursors. Using an optimized and specific algorithm, we identified 38 miRNA precursors and mature sequences in *M. enterolobii*. In *M. arenaria*, we analyzed three different genomes that were available. Based on the first genome, we identified 43 sequences of miRNA precursors and their mature forms. The second genome of *M. arenaria* yielded 40 sequences, and the third genome analysis of *M. arenaria* identified 41 sequences of

miRNA precursors and their mature forms, which are listed in Supplementary Tables S19, S20, S21, and S22.

We analyzed the structural and thermodynamic characteristics of all identified miRNAs. Previous studies have shown that miRNA precursor sequences have significantly higher negative minimal folding free energy indexes (MFEIs) than other types of RNA, such as tRNA and rRNA. The predicted miRNA precursors in *M. enterolobii* had a mean MFEI of -0.814, ranging from -1.105 to -0.502. The predicted precursors of miRNAs in the first genome of *M. arenaria* had a mean MFEI of -0.826, ranging from -1.165 to -0.502. The predicted miRNA precursors in the second genome of *M. arenaria* showed a mean MFEI of -0.894, ranging from -1.298 to -0.601.

Finally, the third genome of *M. arenaria* was found to contain miRNA precursors with a mean minimum free energy index (MFEI) of -0.846, ranging from -1.225 to -0.625.

#### MiRNA characterization

To further characterize the miRNAs in the two analyzed species, miRNAs from the mir-87 family of each species and from the first genome of *M. arenaria* were selected, due to their high conservation in the species studied and their prevalence in the reference species of the study. Sequence and phylogenetic distributions of this family of miRNAs were analyzed.

For sequence conservation analysis, the predicted miRNAs were aligned to 5 miRNAs from the same homologous family. The miRNA precursors identified in this study exhibited significant conservation in their sequences and secondary structures, particularly in the mature regions of the miRNAs, compared to their homologs.

The identified and characterized miRNA precursors exhibited 100% conservation in their seed regions, which is crucial as miRNAs regulate target genes by binding to their 3' UTR

(Lai 2002; Filipowicz et al. 2008; Kehl et al. 2017). The binding specificity is primarily determined by the seed region, comprising eight nucleotides (Grimson et al. 2007), rather than the entire mature miRNA sequence (Lee et al. 2003; De Wit et al. 2009; Bartel 2009).

Mir-87 is known to play a crucial role in regulating dendrite regeneration and developmental timing in the nervous system (Chang et al. 2004; Shenoy and Blelloch 2014; Kitatani et al. 2020). Kitatani et al. (2020) identified miR-87 as a critical regulator of dendrite regeneration, which works autonomously in the cell. The study proposed a model where miR-87 upregulation is a critical determinant for dendrite growth.

In *M. enterolobii*, mir-87 was aligned with miRNAs from several species, including *C. elegans* (cel-mir), *Caenorhabditis remanei* (crm-mir), *Panagrellus redivivus* (prd-mir), *Brugia malayi* (bma-mir), and *Ascaris suum* (asu-mir), and found to have its mature region between amino acids 65 to 87. Its seed region is 100% conserved. Mir-87 in *M. enterolobii* exhibited significant conservation in its sequence and secondary structure. Figures Figure 14 and Figure 15 show the alignment and conservation analysis of mir-87.

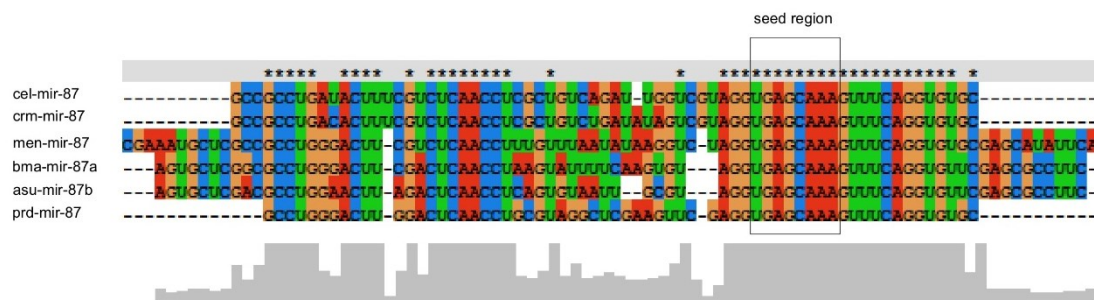
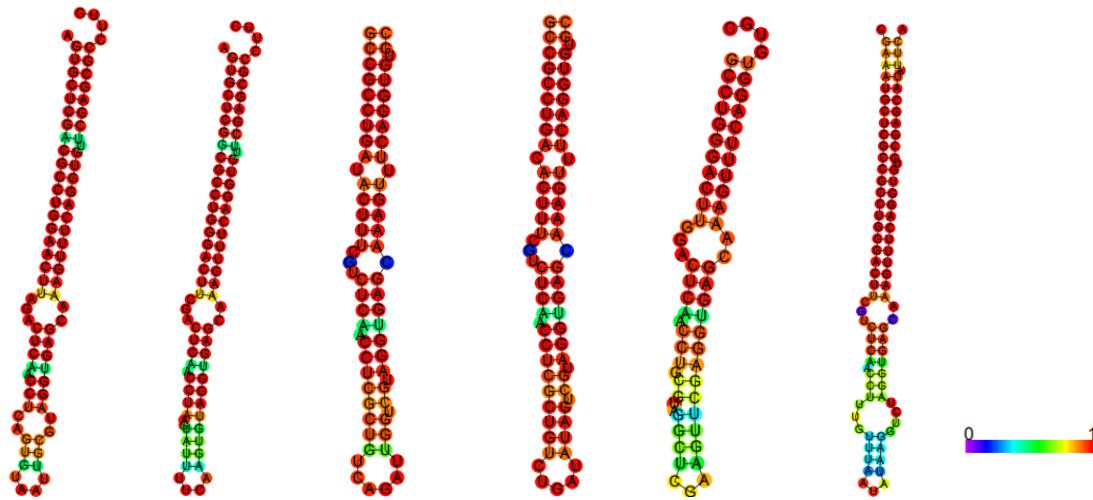


Figure 14. High-confidence alignment between *M. enterolobii* mir-87 family miRNAs and their homologs. MiRNA studied: men-mir-87.



asu-mir-87    bma-mir-87    cel-mir-87    crm-mir-87    prd-mir-87    pre-mir de *M. enterolobii*

Figure 15. Secondary structures of *M. enterolobii* mir-87 family miRNAs and their homologs.

The mature region of mir-87 in *M. arenaria* was found to be located between amino acids 62 to 84, and its seed region was found to be completely conserved, when aligned to miRNAs from other species, including *B. malayi* (bma-mir), *A. suum* (asu-mir), *P. redivivus* (prd-mir), *C. elegans* (cel-mir), and *Pristionchus pacificus* (ppc-mir). The sequence and secondary structure of mir-87 in *M. arenaria* were also found to be highly conserved.

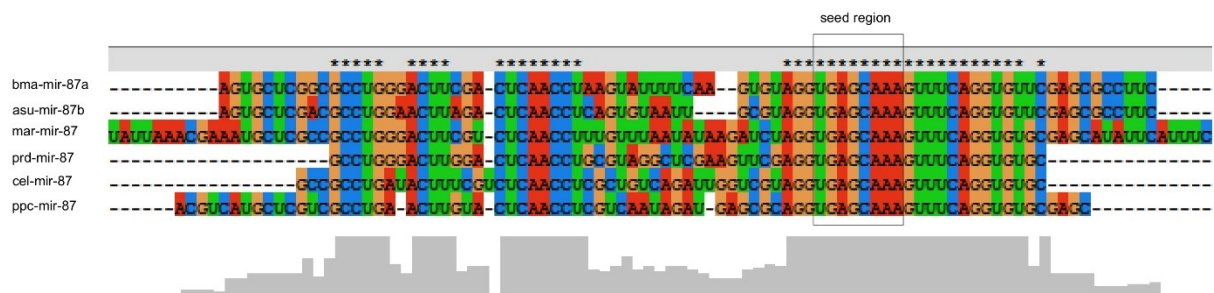


Figure 16. High-confidence alignment between *M. arenaria* mir-87 family miRNAs and their homologs. MiRNA studied: mar-mir-87.

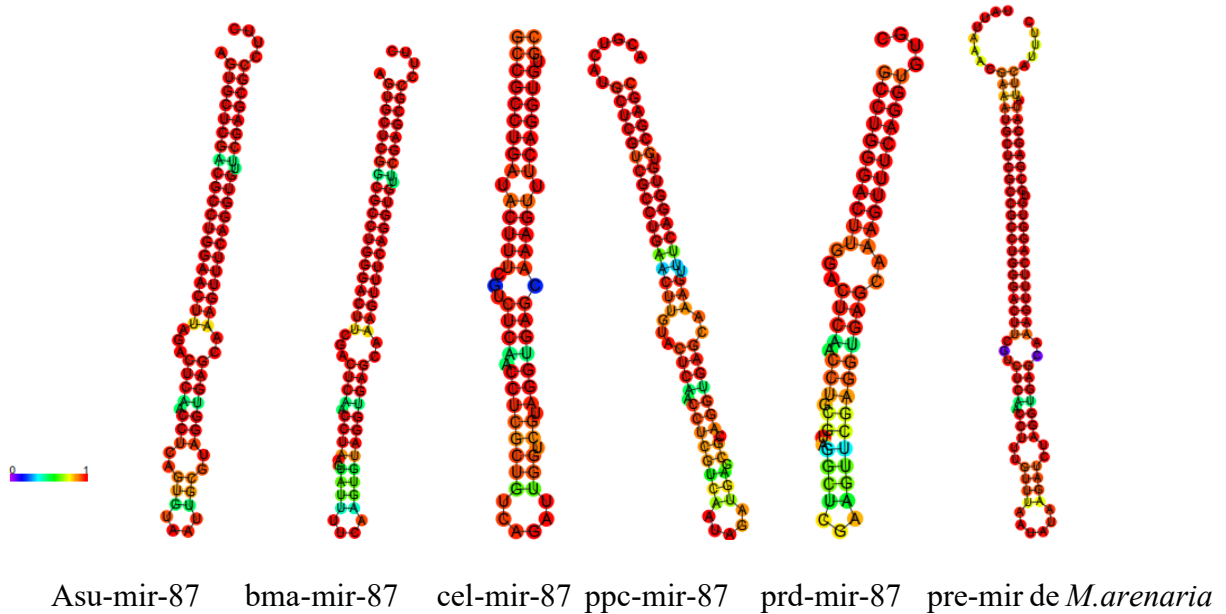


Figure 17. Secondary structures of miRNAs from the *M. arenaria* mir-87 family and their homologs.

#### Phylogenetic analysis of miRNAs

The miRNA family mir-87 in *M. enterolobii* (Figure 18) was analyzed and compared to 20 homologs, including species from the phyla Nematoda, Arthropoda, and Annelida, such as *C. elegans* (cel), *Caenorhabditis briggsae* (cbr), *Caenorhabditis brenneri* (cnb), *Caenorhabditis remanei* (crm), *Heligmosomoides polygyrus* (hpo), *Pristionchus pacificus* (ppc), *Haemonchus contortus* (hco), *P. redivivus* (prd), *B. malayi* (bma), *A. suum* (asu), *Ixodes scapularis* (isc), *Tribolium castaneum* (tca), *Acyrtosiphon pisum* (api), *Apis mellifera* (ame), *Capitella teleta* (cte), *Heliconius melpomene* (hme), and *Tetranychus urticae* (tur). The phylogenetic analysis revealed well-defined clades that represented the nematode, arthropod, and annelid phyla. The miRNA under study, men-mir-87, was found to be closely related to arthropod mir-87.

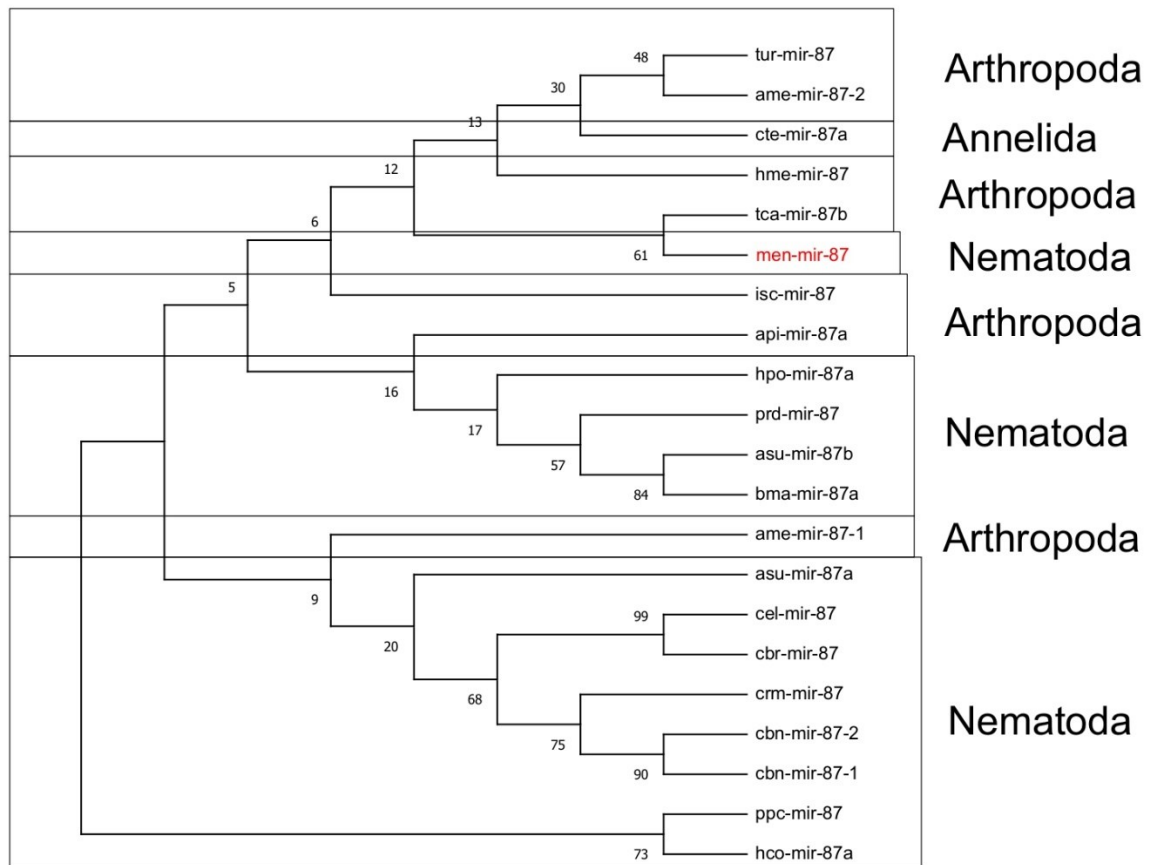


Figure 18. Phylogenetic tree of the *M. enterolobii* mir-87 miRNA family.

In regards to the phylogenetic analyses of miRNAs from *M. arenaria*, the first genotype was selected for further investigation. The miRNA phylogenetic tree of the mir-87 family (Figure 19) was constructed by comparing homologs from various species, including *Drosophila erecta* (dre), *Drosophila yakuba* (dya), *Tetranychus urticae* (tur), *A. pisum* (api), *A. mellifera* (ame), *H. melpomene* (hme), *H. polygyrus* (hpo), *B. malayi* (bma), *A. suum* (asu), *P. redivivus* (prd), *Tribolium castaneum* (tca), *Haemonchus contortus* (hco), *Pristionchus pacificus* (ppc), *Ixodes scapularis* (isc), *C. brenneri* (cbn), *C. remanei* (crm), *C. elegans* (cel), and *C. briggsae* (cbr). The phylogeny observed followed the evolutionary relationships of the tree of life, with well-defined clades that included representation of the phyla arthropods and



nematodes.

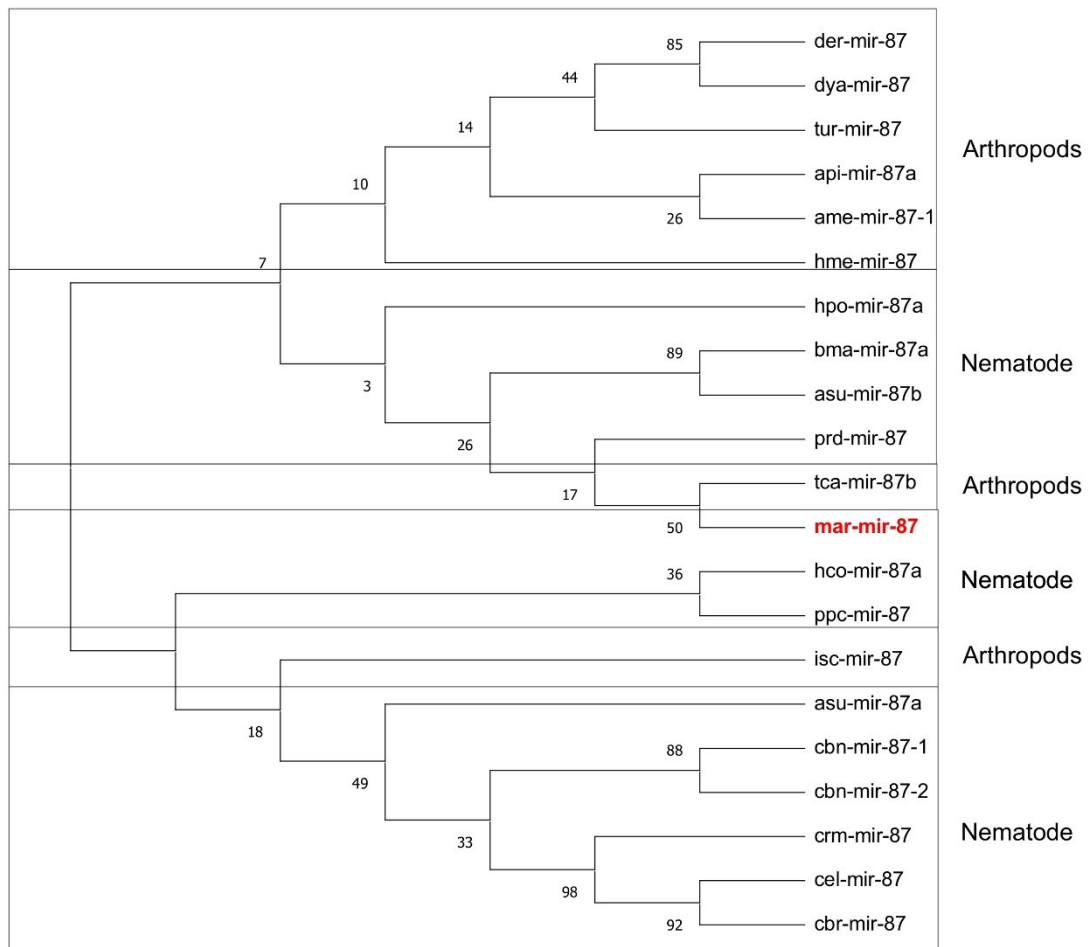


Figure 19. Phylogenetic tree of the mir-87 miRNA family of *M. arenaria*.

## CONCLUSIONS

Given the significant impact of plant nematodes on agriculture and the associated economic losses, this study's findings expand the knowledge on miRNAs in plant nematodes. These results advance our understanding of the crucial roles of miRNA-based regulatory mechanisms, including processing pathways and gene expression, in plant nematodes. Additionally, these findings provide insights that can guide future research in this area.

## References

- Ambros V (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature* 431:350–355.
- Barnes I, Becker KH and Ruppert L (1993) FTIR product study of the self-reaction of  $\beta$ -hydroxyethyl peroxy radicals. *Chem Phys Lett* 203:295–301.
- Bartel DP (2009) MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* 136:215–233.
- Bebber DP, Holmes T and Gurr SJ (2014) The global spread of crop pests and pathogens. *Global Ecology and Biogeography* 23:1398–1407.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM and Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409:363–366.
- Bohmert K, Camus I, Bellini C, Bouchez D, Caboche M and Benning C (1998) AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. *EMBO J* 17:170–180.
- Cai X, Schäfer A, Lu S, Bilello JP, Desrosiers RC, Edwards R, Raab-Traub N and Cullen BR (2006) Epstein–Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed. *PLoS Pathog* 2:e23.
- Cardoso TC de S, de Araújo CB, Portilho LG, Mendes LGA, Alves TC, Silva GC, Ribeiro THC, Gandolfi PE, Morais ER and do Amaral LR (2020) Computational prediction and characterisation of miRNAs and their pathway genes in human schistosomiasis caused by *Schistosoma haematobium*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 115:
- Carneiro RDG (1992) *Principios e Tendencias do Controle Biologico de Nematoides com Fungos Nematofagos*. Embrapa
- Chang S, Johnston Jr RJ, Frøkjær-Jensen C, Lockery S and Hobert O (2004) MicroRNAs act sequentially and asymmetrically to control chemosensory laterality in the nematode. *Nature* 430:785–789.

- Ciechanowska K, Pokornowska M and Kurzyńska-Kokorniak A (2021) Genetic insight into the domain structure and functions of dicer-type ribonucleases. *Int J Mol Sci* 22:616.
- Danchin EGJ, Arguel M-J, Campan-Fournier A, Perfus-Barbeoch L, Magliano M, Rosso M-N, Da Rocha M, Da Silva C, Nottet N and Labadie K (2013) Identification of novel target genes for safer and more specific control of root-knot nematodes from a pan-genome mining. *PLoS Pathog* 9:e1003745.
- Dasgupt I and Chatterjee A (2021) Recent advances in miRNA delivery systems. *Methods and Protocols* 4:1–10.
- De Ley P and Blaxter ML (2004) A new system for Nematoda: combining morphological characters with molecular trees, and translating clades into ranks and taxa. *Proceedings of the Fourth International Congress of Nematology, 8-13 June 2002, Tenerife, Spain*. Brill, pp 633–653
- de Souza Gomes M, Muniyappa MK, Carvalho SG, Guerra-Sá R and Spillane C (2011) Genome-wide identification of novel microRNAs and their target genes in the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Genomics* 98:96–111.
- De Wit E, Linsen SE V, Cuppen E and Berezikov E (2009) Repertoire and evolution of miRNA genes in four divergent nematode species. *Genome Res* 19:2064–2074.
- Decraemer W and Hunt DJ (2006) *Structure and classification*: Perry, RN, Moens, M., Eds. *Plant nematology* 3–32.
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN and Sonenberg N (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9:102–114.
- Filippov V, Solovyev V, Filippova M and Gill SS (2000) A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. *Gene* 245:213–221.
- Fortin KR, Nicholson RH and Nicholson AW (2002) Mouse ribonuclease III. cDNA structure, expression analysis, and chromosomal location. *BMC Genomics* 3:1–9.

- Gomes MS, Cabral FJ, Jannotti-Passos LK, Carvalho O, Rodrigues V, Baba EH and Sá RG (2009) Preliminary analysis of miRNA pathway in *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Int* 58:61–68.
- Grimson A, Farh KK-H, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP and Bartel DP (2007) MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 27:91–105.
- Hammond SM (2015) An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev* 87:3–14.
- Han J, Lee Y, Yeom K-H, Kim Y-K, Jin H and Kim VN (2004) The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 18:3016–3027.
- Haque NGM and Gowen RS (1989) Chemical control of nematodes. In: Brown RH and Kerry BR (eds) *Principles and practice of nematode control in crops.*, London Acad. Press. London, pp 131–173
- He L and Hannon GJ (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 5:522–531.
- Hussey R and Janssen J (2002) *Plant Resistance to Parasitic Nematodes*. CAB International
- Iorio M V, Visone R, Di Leva G, Donati V, Petrocca F, Casalini P, Taccioli C, Volinia S, Liu C-G and Alder H (2007) MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res* 67:8699–8707.
- Jiang F, Ye X, Liu X, Fincher L, McKearin D and Liu Q (2005) Dicer-1 and R3D1-L catalyze microRNA maturation in *Drosophila*. *Genes Dev* 19:1674–1679.
- Jiang P, Wu H, Wang W, Ma W, Sun X and Lu Z (2007) MiPred: classification of real and pseudo microRNA precursors using random forest prediction model with combined features. *Nucleic Acids Res* 35:W339–W344.
- Johanson TM, Lew AM and Chong MMW (2013) MicroRNA-independent roles of the RNase III enzymes Drosha and Dicer. *Open Biol* 3:130144.

- Kehl T, Backes C, Kern F, Fehlmann T, Ludwig N, Meese E, Lenhof H-P and Keller A (2017) About miRNAs, miRNA seeds, target genes and target pathways. *Oncotarget* 8:107167.
- Kitatani Y, Tezuka A, Hasegawa E, Yanagi S, Togashi K, Tsuji M, Kondo S, Parrish JZ and Emoto K (2020) *Drosophila* miR-87 promotes dendrite regeneration by targeting the transcriptional repressor *Tramtrack69*. *PLoS Genet* 16:e1008942.
- Krishnatreya DB, Baruah PM, Dowarah B, Chowrasia S, Mondal TK and Agarwala N (2021) Genome-wide identification, evolutionary relationship and expression analysis of AGO, DCL and RDR family genes in tea. *Sci Rep* 11:1–18.
- Lai EC (2002) Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet* 30:363–364.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O and Kim S (2003) The nuclear RNase III *Drosha* initiates microRNA processing. *Nature* 425:415–419.
- Lee Y, Han J, Yeom K-H, Jin H and Kim VN (2006) *Drosha* in primary microRNA processing. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 51–57
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K, Lee S, Baek SH and Kim VN (2004a) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23:4051–4060.
- Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K, He Z, Sontheimer EJ and Carthew RW (2004b) Distinct roles for *Drosophila* *Dicer-1* and *Dicer-2* in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* 117:69–81.
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS and Johnson JM (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433:769–773.
- Lorenzen S (1994) *The phylogenetic systematics of free living nematodes*. Ray society

- Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE and Kutay U (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science* (1979) 303:95–98.
- MacRae IJ, Zhou K, Li F, Repic A, Brooks AN, Cande WZ, Adams PD and Doudna JA (2006) Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* (1979) 311:195–198.
- Mallory A and Vaucheret H (2010) Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. *Plant Cell* 22:3879–3889.
- McCarter\* JP (2008) Molecular approaches toward resistance to plant-parasitic nematodes.
- Mistry J, Chuguransky S, Williams L, Qureshi M, Salazar GA, Sonnhammer ELL, Tosatto SCE, Paladin L, Raj S, Richardson LJ et al. (2021) Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Res* 49:D412–D419.
- Mitreva M, Blaxter ML, Bird DM and McCarter JP (2005) Comparative genomics of nematodes. *TRENDS in Genetics* 21:573–581.
- NCBI (2023) BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. In: National Library of Medicine. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Accessed 20 Apr 2023
- O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang C V and Mendell JT (2005) c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 435:839–843.
- Olsen PH and Ambros V (1999) The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* 216:671–680.
- Parker JS (2010) How to slice: snapshots of Argonaute in action. *Silence* 1:1–10.
- Rich JR, Brito JA, Kaur R and Ferrell JA (2009) Weed species as hosts of *Meloidogyne*: a review. *Nematropica* 157–185.
- Saitou N and Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425.

- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N and Zamore PD (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115:199–208.
- Shenoy A and Blelloch RH (2014) Regulation of microRNA function in somatic stem cell proliferation and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:565–576.
- Susič N, Koutsovoulos GD, Riccio C, Danchin EGJ, Blaxter ML, Lunt DH, Strajnar P, Širca S, Urek G and Stare BG (2020) Genome sequence of the root-knot nematode. *J Nematol* 52:1–5.
- Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596–1599.
- Thompson JD, Gibson TJ and Higgins DG (2003) Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr Protoc Bioinformatics* 2–3.
- Tolia NH and Joshua-Tor L (2007) Slicer and the argonautes. *Nat Chem Biol* 3:36–43.
- UV U of V (2023) RNAalifold web server. In: Institute for Theoretical Chemistry . <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAalifold.cgi>. Accessed 20 Apr 2023
- Valli AA, Santos BACM, Hnatova S, Bassett AR, Molnar A, Chung BY and Baulcombe DC (2016) Most microRNAs in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii* are produced by Dicer-like 3-mediated cleavage of introns and untranslated regions of coding RNAs. *Genome Res* 26:519–529.
- Voinnet O (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* 136:669–687.
- Wang Y, Juranek S, Li H, Sheng G, Tuschl T and Patel DJ (2008) Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature* 456:921–926.
- Wang Y, Juranek S, Li H, Sheng G, Wardle GS, Tuschl T and Patel DJ (2009) Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes. *Nature* 461:754–761.
- Wu H, Xu H, Miraglia LJ and Crooke ST (2000) Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing. *Journal of Biological Chemistry* 275:36957–36965.



Ying S-Y and Lin S-L (2004) Intron-derived microRNAs—fine-tuning gene functions. *Gene* 342:25–28.

Zuker M and Stiegler P (1981) Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Res* 9:133–148.

UV U of V (2023) RNAfold web server. In: Institute for Theoretical Chemistry . <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>. Accessed 20 Apr 2023

NCBI (2023) Conserved Domains Database (CDD) and Resources. In: National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>. Accessed 20 Apr 2023

**SUPPLEMENTARY MATERIAL**

**Supplementary table S1** - *C. elegans* and *D. melanogaster* genes.

**Supplementary table S2** - *M. arenaria* orthologous proteins.

**Supplementary table S3** - *M. enterolobii* orthologous proteins.

**Supplementary table S4** - *M. floridensis* orthologous proteins.

**Supplementary table S5** - *M. graminicola* orthologous proteins.

**Supplementary Table S6** - *M. hapla* orthologous proteins.

**Supplementary Table S7** - Orthologous proteins of *M. incognita*.

**Supplementary table S8** - *M. javanica* orthologous proteins.

**Supplementary table S9** - Conserved domains of *M. arenaria* proteins.

**Supplementary table S10** - Conserved domains of *M. enterolobii* proteins.

**Supplementary table S11** - Conserved domains of *M. floridensis* proteins.

**Supplementary table S12** - Conserved domains of *M. graminicola* proteins.

**Supplementary table S13** - Conserved domains of *M. hapla* proteins.

**Supplementary Table S14** - Conserved domains of *M. incognita* proteins.

**Supplementary table S15** - Conserved domains of *M. javanica* proteins.

**Supplementary Table S16** - Active sites of Argonats.

**Tabela suplementar 17** - Sítios ativos de Dicer 1.

**Supplementary Table S18** - Active sites of Drosha.

**Supplementary table S19** - MiRNA precursors and mature sequences in *M. enterolobii*.

**Supplementary table S20** - MiRNA precursors and mature sequences in *M. arenaria* 1.

**Supplementary table S21** - MiRNA precursors and mature sequences in *M. arenaria* 2.

**Supplementary table S22** - MiRNA precursors and mature sequences in *M. arenaria* 3.

## CONCLUSÃO

Dado o impacto significativo dos fitonematoides na agricultura e as perdas econômicas associadas, os resultados deste estudo ampliam o conhecimento sobre miRNAs em fitonematoides. Esses resultados avançam nossa compreensão dos papéis cruciais dos mecanismos regulatórios baseados em miRNA, incluindo vias de processamento e expressão gênica, em nematoides de plantas. Além disso, essas descobertas fornecem informações que podem orientar futuras pesquisas nessa área.

## REFERÊNCIAS

- ABAD, Pierre et al. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 909-915, 2008.
- AHMED, Rina et al. Conserved miRNAs are candidate post-transcriptional regulators of developmental arrest in free-living and parasitic nematodes. **Genome biology and evolution**, v. 5, n. 7, p. 1246-1260, 2013. <https://doi.org/10.1093/gbe/evt086>
- ARRUDA, Juliana Ramirez et al. Data mining e caracterização de novos miRNAs com função no envelhecimento de nematóides *C. elegans*. 2018.
- BARROS, Juliana São Luiz de et al. **Taxonomia morfológica e filogenia molecular de Physaloptera (Nematoda: spirurida)**. 2015. Tese de Doutorado.
- BORGES, Rodrigo Abdul Khalek. Piramidação gênica para resistência horizontal a nematóides via silenciamento gênico. 2016.
- C. ELEGANS SEQUENCING CONSORTIUM\*. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2012-2018, 1998. <https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2012>
- CAIXETA, Larissa de Brito. Diversidade de nematóides em sistemas de uso do solo nos biomas de mata atlântica e caatinga e aspectos taxonômicos e filogenéticos da família Telotylenchidae. 2015. vi, 186 f., il. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2015.
- CARDOSO, Thaís Cunha de Sousa et al. Computational prediction and characterisation of miRNAs and their pathway genes in human schistosomiasis caused by *Schistosoma haematobium*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, 2020. <https://doi.org/10.1590/0074-02760190378>
- CASTRO, JM da C. et al. Levantamento de fitonematóides em cafezais do Sul de Minas Gerais. **Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2008.
- CHEN, Kevin; RAJEWSKY, N. Deep conservation of microRNA-target relationships and 3'UTR motifs in vertebrates, flies, and nematodes. In: Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2006. p. 149-156. <https://doi.org/10.1101/sqb.2006.71.039>
- COELHO, Camila Cristina. **Caracterização preliminar dos hábitos extremófilos, vitelinas e proteases de Panagrolaimus sp. CEW2, um nematoide de vida livre isolado da Região Amazônica**. 2015. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- COGHLAN, Avril. Nematode genome evolution. **WormBook**, p. 1, 2005. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.15.1>
- COSTA, Everton de Brito Oliveira; PACHECO, Cristiane. Micro-RNAs: Perspectivas atuais da regulação da expressão gênica em eucariotos. **Biosaúde**, v. 14, n. 2, p. 81-93, 2016.
- DA SILVA, Julio Carlos Pereira; FIGUEIREDO, Yasmim Freitas. Avanços na biotecnologia aplicada ao controle de fitonematóides. 2018.

- DAI, Xinbin; ZHAO, Patrick Xuechun. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. **Nucleic acids research**, v. 39, n. suppl\_2, p. W155-W159, 2011. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr319>
- DASGUPTA, Ishani; CHATTERJEE, Anushila. Recent advances in miRNA delivery systems. **Methods and Protocols**, v. 4, no. 1, pg. 10, 2021. <https://doi.org/10.3390/mps4010010>
- DE SOUZA GOMES, Matheus et al. Genome-wide identification of novel microRNAs and their target genes in the human parasite *Schistosoma mansoni*. **Genomics**, v. 98, n. 2, p. 96-111, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.05.007>
- DE WIT, Elzo et al. Repertoire and evolution of miRNA genes in four divergent nematode species. **Genome research**, v. 19, n. 11, p. 2064-2074, 2009. <https://doi.org/10.1101/gr.093781.109>
- DIETERICH, Christoph et al. The genome of *Pristionchus pacificus* provides a unique insight into nematode lifestyle and parasitism. **Nature genetics**, v. 40, no. 10, p. 1193, 2008. <https://doi.org/10.1038/ng.227>
- ELLING, Axel A. Major emerging problems with minor *Meloidogyne* species. **Phytopathology**, v. 103, n. 11, p. 1092-1102, 2013. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-13-0019-RVW>
- ENDER, Christine; MEISTER, Gunter. Argonaute proteins at a glance. **Journal of cell science**, v. 123, n. 11, p. 1819-1823, 2010. <https://doi.org/10.1242/jcs.055210>
- EVES-VAN DEN AKKER, Sebastian et al. The genome of the yellow potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, reveals insights into the basis of parasitism and virulence. **Genome biology**, v. 17, n. 1, p. 1-23, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0985-1>
- FERRAZ, SILAMAR; GUIMARÃES, Ednaldo Carvalho. Importância dos fitonematoides na agricultura, 2016.
- FERREIRA, A. J. et al. Validação da estratégia de silenciamento gênico visando indução de resistência a *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines* em soja GM. In: **Embrapa Soja- Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 6., 2012, Cuiabá. Soja: integração nacional e desenvolvimento sustentável: anais. Brasília, DF: Embrapa, 2012, 2012.
- FIGUERÊDO, Djayana Karla Cavalcanti de. **Diversidade de nematoides em relação a diferentes águas residuárias**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso. Brasil.
- FRAGOSO, R. da R. et al. Interação molecular planta-nematóide. **Embrapa Cerrados- Documentos (INFOTECA-E)**, 2007.
- GKIRTZOU, Katerina et al. MatureBayes: a probabilistic algorithm for identifying the mature miRNA within novel precursors. **PLoS one**, v. 5, n. 8, p. e11843, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011843>
- GOULART, Alexandre Moura Cintra. Aspectos gerais sobre nematoides das lesões radiculares (gênero *Pratylenchus*). **Embrapa Cerrados-Documentos (INFOTECA-E)**, 2008.
- HAN, Jinju et al. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. **Genes & development**, v. 18, n. 24, p. 3016-3027, 2004. <https://doi.org/10.1101/gad.1262504>

- HUANG, Qi-Xing et al. MicroRNA discovery and analysis of pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* by deep sequencing. **PLoS One**, v. 5, n. 10, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013271>
- JIANG, Feng et al. Dicer-1 and R3D1-L catalyze microRNA maturation in *Drosophila*. **Genes & development**, v. 19, n. 14, p. 1674-1679, 2005. <https://doi.org/10.1101/gad.1334005>
- JIANG, Peng et al. MiPred: classification of real and pseudo microRNA precursors using random forest prediction model with combined features. **Nucleic acids research**, v. 35, n. suppl\_2, p. W339-W344, 2007. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm368>
- KAMITANI, Fernando Luiz. **Caracterização molecular de isolados de nematóides entomopatogênicos, *Heterorhabditis* spp. e seus simbiosites, *Photorhabdus* spp., provenientes de Monte Negro, RO**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- KOSCIANSKA, Edyta; STAREGA-ROSLAN, Julia; KRZYZOSIAK, Włodzimierz J. The role of Dicer protein partners in the processing of microRNA precursors. **PloS one**, v. 6, n. 12, p. e28548, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028548>
- KRISHNATREYA, Debasish B. et al. Genome-wide identification, evolutionary relationship and expression analysis of AGO, DCL and RDR family genes in tea. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-18, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87991-5>
- LEE, Y. et al. Drosha in primary microRNA processing. In: **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006. p. 51-57. <https://doi.org/10.1101/sqb.2006.71.041>
- LIMA, Roberta Ferreira Cruz de. Estudo para validação de genes de algodão potencialmente envolvidos na resistência ao nematóide *Meloidogyne* incognita. 2011.
- LINS, Tulio Cesar de Lima. Variação estrutural no número de cópias e sua implicação na expressão de microRNA em humanos. 2014.
- MASONBRINK, Rick et al. The genome of the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) reveals complex patterns of duplications involved in the evolution of parasitism genes. **BMC genomics**, v. 20, n. 1, p. 1-14, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5485-8>
- MOENS, Maurice et al. *Meloidogyne* species—a diverse group of novel and important plant parasites. **Root-knot nematodes**, v. 1, p. 483, 2009. <https://doi.org/10.1079/9781845934927.0001>
- MOREA, Edna Gicela Ortiz. Papel funcional de microRNAs na arquitetura vegetativa e radicular de plantas. 2013.
- NERY, P. S.; DUARTE, E. R.; MARTINS, E. R. Eficácia de plantas para o controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes: revisão de estudos publicados. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, p. 330-338, 2009. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722009000300016>
- OPPERMAN, Charles H. et al. Sequence and genetic map of *Meloidogyne* hapla: A compact nematode genome for plant parasitism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 39, p. 14802-14807, 2008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805946105>
- QUEIROZ, Fábio Ribeiro et al. **Caracterização da maquinaria de processamento de miRNAs e piRNAs em *Biomphalaria glabrata* e o efeito da infecção por *Schistosoma mansoni* no processo**. 2015. Tese de Doutorado.

- RICARTE FILHO, Júlio; KIMURA, Edna Teruko. MicroRNAs: nova classe de reguladores gênicos envolvidos na função endócrina e câncer. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 6, p. 1102-1107, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302006000600018>
- RICH, J. R. et al. Weed species as hosts of Meloidogyne: a review. **Nematropica**, p. 157-185, 2009.
- ROSSI, Carolina. **As proteínas do vitelo do nematoide entomopatogênico Heterorhabditis baujardi LPP7**. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- SAITOU, Naruya; NEI, Masatoshi. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.
- SHI, Zhen et al. High-throughput sequencing reveals extraordinary fluidity of miRNA, piRNA, and siRNA pathways in nematodes. **Genome research**, v. 23, n. 3, p. 497-508, 2013. <https://doi.org/10.1101/gr.149112.112>
- SILVA, Franciane Gomes da et al. Levantamento de fitonematóides nas culturas de soja e milho no município de Jataí-Go. 2007.
- SOUZA JÚNIOR, José Dijair Antonio de. Análise funcional de genes de Meloidogyne incognita envolvidos na interação planta-nematoide. 2012.
- SOUZA, Djair dos Santos de Lima. Seleção e avaliação funcional de fatores potencialmente envolvidos com interações entre plantas e nematoides parasitas. 2008.
- STEIN, Lincoln D. et al. The genome sequence of Caenorhabditis briggsae: a platform for comparative genomics. **PLoS Biol**, v. 1, n. 2, p. e45, 2003.
- SUBRAMANIAN, Parthiban et al. Stage-wise identification and analysis of miRNA from root-knot nematode Meloidogyne incognita. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 10, p. 1758, 2016. <https://doi.org/10.3390/ijms17101758>
- SUSIČ, Nick et al. Genome sequence of the root-knot nematode Meloidogyne luci. **Journal of nematology**, v. 52, 2020. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2020-025>
- TAMURA, Koichiro et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular biology and evolution**, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>
- TROJAN, Daiane Garabeli; VAZ, Lucas Solek Barreto. metodologias para estudo e diagnóstico de nematoides parasitas de plantas de brasil. in: convibra 2014 on line conferencee, 2014. conference proceedings 2014, 2014. (anais de congresso).
- WANG, Yunsheng et al. Identification of microRNAs in Meloidogyne incognita using deep sequencing. **PLoS one**, v. 10, n. 8, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133491>
- WINTER, Alan D. et al. Diversity in parasitic nematode genomes: the microRNAs of Brugia pahangi and Haemonchus contortus are largely novel. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 4, 2012. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-4>
- ZHANG, Yanqiong et al. Identification and characterization of microRNAs in the plant parasitic root-knot nematode Meloidogyne incognita using deep sequencing. **Functional & integrative genomics**, v. 16, n. 2, p. 127-142, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10142-015-0472-x>

ZUKER, Michael; STIEGLER, Patrick. Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. **Nucleic acids research**, v. 9, n. 1, p. 133-148, 1981. <https://doi.org/10.1093/nar/9.1.133>

## ANEXOS

**Anexo 1** – Instruções para autores da revista.

Revista: Genetics and Molecular Research (GMR).

ISSN: 16765680

<https://geneticsmr.com/>

RESUMO DE ESTILO E FORMATO

FORMATO DE ARQUIVO

Os arquivos de manuscritos podem estar nos seguintes formatos: doc ou docx. os documentos do microsoft word não devem ser bloqueados ou protegidos.

COMPRIMENTO



Os manuscritos podem ter qualquer comprimento. não há restrições quanto à contagem de palavras, número de figuras ou quantidade de informações de suporte. Nós encorajamos você a apresentar e discutir suas descobertas de forma concisa.

## FONTE

Use fonte times new roman e tamanho 12.

## TÍTULOS

Limite as seções e subseções do manuscrito a 3 níveis de título. Certifique-se de que os níveis dos títulos estejam claramente indicados no texto do manuscrito.

## DISPOSIÇÃO

O texto do manuscrito deve estar em espaço duplo. não formate o texto em várias colunas.

## NÚMEROS DE PÁGINA E LINHA

Inclua números de página e números de linha no arquivo do manuscrito.

## NOTAS DE RODAPÉ

Notas de rodapé não são permitidas. Se o seu manuscrito contiver notas de rodapé, mova as informações para o texto principal ou para a lista de referências, dependendo do conteúdo.

## LINGUAGEM

Os manuscritos devem ser submetidos em inglês.

## ABREVIATURAS

Defina abreviaturas na primeira aparição no texto. Não use abreviações não padronizadas. Os arquivos de informações não compatíveis são carregados separadamente, a menos que apareçam pelo menos três vezes no texto. Reduza ao mínimo as abreviações.

## EQUAÇÕES

Recomendamos o uso de `mathtype` para exibição e equações em linha, pois fornecerá o resultado mais confiável. Se isso não for possível, o `equation editor` é aceitável.

Evite usar o `mathtype` ou o `equation editor` para inserir variáveis simples (por exemplo, “ $a^2 + b^2 = c^2$ ”), símbolos gregos ou outros (por exemplo,  $\beta$ ,  $\delta$  ou ' [prime]) ou operadores matemáticos (por exemplo,  $x$ ,  $\geq$ , ou  $\pm$ ) em texto corrido. Sempre que possível, insira símbolos únicos como texto normal com os valores unicode (hex) corretos.

Não use `mathtype` ou `equation editor` apenas para uma parte de uma equação. em vez disso, certifique-se de que toda a equação seja incluída. evite equações “híbridas” em linha ou de exibição, nas quais parte é texto e parte é `mathtype`, ou parte é `mathtype` e parte é `editor de equações`.

## NOMENCLATURA

Use nomenclatura correta e estabelecida sempre que possível.

## UNIDADES DE MEDIDA

Use unidades do si. Se você não os usar exclusivamente, forneça o valor si entre parênteses após cada valor.

## DROGAS

Forneça o nome internacional não proprietário recomendado (rinn).

## NOMES DE ESPÉCIES

Escreva em itálico (por exemplo, *homo sapiens* ). Escreva por extenso o gênero e a espécie, tanto no título do manuscrito quanto na primeira menção de um organismo em um artigo.

Após a primeira menção, pode ser usada a primeira letra do nome do gênero seguida do nome completo da espécie (por exemplo, *h. sapiens* ).

## GENES, MUTAÇÕES, GENÓTIPOS E ALELOS

Escreva em itálico. use o nome recomendado consultando o banco de dados de nomenclatura genética apropriado (por exemplo, *hugo* para genes humanos). Prefixos de genes, como aqueles usados para oncogenes ou localização celular, devem ser mostrados em caracteres romanos (por exemplo, *v-fes*, *c-myc*).

## ORGANIZAÇÃO DO MANUSCRITO

A maioria dos manuscritos deve ser organizada da seguinte forma. As instruções para cada elemento aparecem abaixo.

Título

Autores

Afiliações

Abstrato

Introdução

Material e métodos

Resultados

Discussão

Agradecimentos

Referências

Material suplementar

A uniformidade no formato facilita a experiência dos leitores e usuários da revista.

Observe também que os resultados e a discussão podem ser combinados em uma seção de resultados/discussão e que uma seção de conclusão também pode ser incluída.

## OUTROS ELEMENTOS

As legendas das figuras são inseridas imediatamente após o primeiro parágrafo em que a figura é citada. Os arquivos de figuras são carregados separadamente.

As tabelas são inseridas imediatamente após o primeiro parágrafo em que são citadas.

Os arquivos de informações de suporte são carregados separadamente.

## PARTES DE UMA SUBMISSÃO

### Título

Inclua um título completo e um título curto para o manuscrito.

TÍTULO	COMPRIMENTO	DIRETRIZES	EXEMPLOS
<b>Título completo</b>	150 caracteres	Específico, descritivo, conciso e compreensível para leitores fora do campo. Não deve inferir informações de resultado.	Haplótipos de <i>qGL3</i> e seus papéis na regulação do tamanho de grão com alelos <i>GS3 em arroz</i> Associação de polimorfismos da IL-18 com artrite reumatóide: uma meta-análise
<b>título atual</b>	60 caracteres	Informe o tema do estudo	Haplótipos de <i>qGL3</i> e seus papéis reguladores com polimorfismos <i>GS3 IL-18</i> e artrite reumatóide

Os títulos devem ser escritos com letras maiúsculas apenas na primeira palavra e nos nomes das espécies/genes. evite abreviaturas especializadas, se possível. Para ensaios clínicos, revisões sistemáticas ou metanálises, o subtítulo deve incluir o desenho do estudo.

## LISTA DE AUTORES

Quem pertence à lista de autores

Todos os autores devem atender aos critérios de autoria descritos na política de autoria.

Aqueles que contribuíram com o trabalho, mas não atendem aos critérios de autoria, podem ser mencionados nos agradecimentos.

## Nomes dos autores e afiliações

Digite os nomes dos autores na página de título do manuscrito e no sistema de submissão online. Na página de título, escreva os nomes dos autores na seguinte ordem:

Iniciais dos nomes próprios e do meio

Sobrenome (sobrenome, sobrenome)

Vírgula entre cada autor, exceto para os dois últimos, onde "e" é usado. não há espaço entre as iniciais.

Cada autor na lista deve ter uma afiliação. A afiliação inclui departamento, universidade ou afiliação organizacional e sua localização, incluindo cidade, estado/província (se aplicável) e país (sem períodos finais).

Se um autor tiver várias afiliações, insira todas as afiliações apenas na página de título.

Os nomes dos autores serão publicados exatamente como aparecem no arquivo do manuscrito. Por favor verifique as informações cuidadosamente para se certificar de que estão corretas.

## Autor correspondente

Um autor correspondente deve ser designado no sistema de submissão, bem como na página de título.

Um autor correspondente deve ser designado no sistema de submissão. Entretanto, o gmr permite a inclusão de mais um autor correspondente que poderá constar no artigo em caso de publicação. Quem for designado como autor correspondente na página de título do arquivo do manuscrito será listado como tal após a publicação.

Inclua um endereço de e-mail para cada autor correspondente listado na página de título do manuscrito.

## folha de rosto

O título, autores e afiliações devem ser incluídos em uma página de título como a primeira página do arquivo do manuscrito.

## ABSTRATO

O resumo vem após a página de título no arquivo do manuscrito e deve ser escrito em um único parágrafo. O texto do resumo também é inserido em um campo separado no sistema de submissão.

O resumo do trabalho deve ser sucinto; não deve exceder 300 palavras. Os autores devem mencionar as técnicas utilizadas sem entrar em detalhes metodológicos e devem resumir os resultados mais importantes.

Embora o resumo esteja conceitualmente dividido em três seções (antecedentes, metodologia/principais descobertas e conclusões/significado), não aplique esses títulos distintos ao resumo dentro do arquivo do artigo.

Não inclua nenhuma citação. Evite abreviaturas especializadas.

Palavras-chave ou termos de indexação (até seis) devem ser incluídos. Cada palavra-chave usa o primeiro

Letra maiúscula e separados por ponto e vírgula.

## TEXTO

### Formatar

Os títulos devem ser em negrito e as primeiras letras maiúsculas e alinhadas à esquerda. Todo o texto deve ser configurado em fonte times new roman, 12 pontos, alinhamento à esquerda, espaçamento simples. Não justifique a margem direita. Deixe apenas um (1) espaço após os pontos. Os parágrafos não devem ser recuados; não deve haver nenhuma linha em branco entre eles. Use retornos de linha apenas no final dos parágrafos. Não use tabulações ou espaços para criar recuos. Use a fonte symbol para símbolos e caracteres especiais. As equações devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos entre parênteses no lado direito da página.

Introdução, material e métodos, resultados, discussão e agradecimentos são considerados como título 1 (todas as letras são maiúsculas).

O título 2, que é um subtítulo do título 1, usa apenas a primeira letra maiúscula. O título 3, que é um subtítulo do título 2, está no mesmo formato, mas em itálico. Tudo em uma linha separada.

Tente usar abreviações no texto com moderação. Escreva as abreviações por extenso antes da primeira vez em que forem usadas no texto. Use o sistema métrico para todas as medições sem períodos (cm, ml, s). Defina todos os símbolos usados em equações e fórmulas. não abrevie a palavra “figura” ou “tabela” em títulos ou texto.

### Introdução

A introdução deve colocar o foco do manuscrito em um contexto mais amplo. Ao redigir a introdução, pense nos leitores que não são especialistas nesse campo. Inclua uma breve revisão da literatura chave. Se houver controvérsias ou discordâncias relevantes na área, elas devem ser mencionadas para que um leitor não especialista possa se aprofundar nessas questões. A introdução deve concluir com uma breve declaração do objetivo geral dos experimentos e um comentário sobre se esse objetivo foi alcançado.

### Material e métodos

Esta seção deve fornecer detalhes suficientes para a reprodução dos resultados. Protocolos para novos métodos devem ser incluídos, mas protocolos bem estabelecidos podem ser simplesmente referenciados.

### Resultados

A seção resultados deve fornecer detalhes de todos os experimentos necessários para apoiar as conclusões do artigo. Não há limite de palavras específico para esta seção, mas detalhes de experimentos que são periféricos ao objetivo principal do artigo e que desviam do foco do artigo não devem ser incluídos. A seção pode ser dividida em subseções, cada uma com um subtítulo conciso. a seção deve ser escrita no passado.

### Discussão

A discussão deve expor as principais conclusões do trabalho junto com algumas explicação ou especulação sobre o significado dessas conclusões. Como as conclusões afetam as suposições e modelos existentes no campo? Como pesquisas futuras podem se basear nessas observações? Quais são os principais experimentos que devem ser feitos?

A discussão deve ser concisa e bem argumentada.



Os resultados e a discussão podem ser combinados em uma seção, se desejado.

### Agradecimentos

Todos os agradecimentos (incluindo os de concessão e apoio financeiro) devem ser digitados em um parágrafo imediatamente anterior à seção de referência. Solicita-se aos autores de manuscritos submetidos ao gmr que declarem a fonte de todo o financiamento que permitiu a realização da pesquisa descrita.

Aqueles que contribuíram para o estudo, mas não atendem aos nossos critérios de autoria, devem ser listados nos agradecimentos com uma descrição da contribuição.

Os autores são responsáveis por garantir que qualquer pessoa nomeada nos agradecimentos concorde em ser nomeada.

Não inclua fontes de financiamento nos agradecimentos ou em qualquer outro lugar no arquivo do manuscrito. as informações de financiamento devem ser inseridas apenas na seção de divulgação financeira do sistema de envio on-line.

### Referências

As referências devem consistir principalmente de artigos de periódicos indexados. Referências para técnicas que são essenciais para a compreensão ou repetição dos métodos devem estar sempre em periódicos de fácil acesso (indexados).

As referências são listadas no final do manuscrito e listadas em ordem alfabética.

Não inclua citações nos resumos.

As referências no texto devem incluir o nome do autor e o ano entre parênteses, por exemplo, (searle, 1961) ou (king e wilson, 1975). Quando uma referência com mais de dois autores é citada, apenas o primeiro autor é citado, por exemplo (comstock et al., 1958). As referências devem ser citadas no texto em ordem cronológica, por exemplo (ideber, 2001; uetz, 2002; ottavai, 2004). Referências a “resultados não publicados” e “artigos submetidos” devem aparecer no texto entre parênteses após o(s) nome(s) do(s) indivíduo(s). Exemplo: (pereira ks, martins pk e silva tm, resultados não publicados). Não mais do que 40 referências devem ser citadas em um artigo completo, 20 referências em uma comunicação curta e 60 referências em um artigo de revisão .

As referências, sob o título “referências”, devem incluir apenas os trabalhos referidos em; o texto. As referências devem ser citadas da seguinte forma: artigos de periódicos - nomes e iniciais dos quatro primeiros autores (depois disso usando et al.), ano, título do periódico abreviado de acordo com pubmed ou web of science, número do volume, números da primeira e última página; livros - nomes dos autores, ano, título completo, edição, editoras, endereço (cidade); artigos publicados em simpósios - nomes dos autores, ano, título completo do livro, nome(s) do(s) editor(es) entre parênteses, editora, endereço (cidade), página inicial e final.

#### Referências de formatação

Como todas as referências serão vinculadas eletronicamente tanto quanto possível aos artigos que citam, a formatação adequada das referências é crucial.

As abreviações dos nomes dos periódicos devem ser aquelas encontradas nos bancos de dados do national center for biotechnology information (ncbi).

FONTE	FORMATAR
<b>artigos publicados</b>	<p>Hou WR, Hou YL, Wu GF, Song Y e outros. (2011). cDNA, clonagem de sequência genômica e superexpressão do gene da proteína ribossômica L9 (rpl9) do panda gigante (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>). <i>Genet. Mol. Res.</i> 10: 1576-1588.</p> <p>Devaraju P, Gulati R, Antony PT, Mithun CB, et al. (2014). A suscetibilidade ao LES em tãmeis do sul da Índia pode ser influenciada pela pressão de seleção genética nos genes TLR2 e TLR9. <i>Mol. imunol.</i> S0161- 5890(14)00313-7.</p>
<b>Artigos aceitos e não publicados</b>	Igual aos artigos publicados, mas substitua “In press” por números de página ou DOI.
<b>Sites ou artigos online</b>	<p>Huynen MMTE, Martens P e Hilderlink HBM (2005). Os impactos da globalização na saúde: uma estrutura conceitual. <i>Saúde global</i>. 1: 14. Disponível em <a href="http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14">[http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14]</a>.</p>
<b>livros</b>	Bates B (1992). <i>Negociando pela vida: uma história social da tuberculose</i> . 1ª ed. University of Pennsylvania Press, Filadélfia.
capítulos de livros	Hansen B (1991). Epidemias e história da cidade de Nova York para o público. In: <i>AIDS e o historiador</i> (Harden VA, Risse GB, eds.). Institutos Nacionais de Saúde, Bethesda.

<b>Artigos depositados (preprints, e-prints ou arXiv)</b>	Krick T, Shub DA, Verstraete N, Ferreira DU, et al. (1991). O metabolismo de aminoácidos entra em conflito com a diversidade de proteínas. Pré-impressão. Disponível: arXiv:1403.3301v1. Acessado em 17 de março de 2014.
<b>Mídia publicada (jornais impressos ou online e artigos de revistas)</b>	Fonte H (2014). Para pinguins já vulneráveis, estudo descobre que a mudança climática é outro perigo O jornal New York Times. 29 de janeiro de 2014. Disponível em [ <a href="http://www.nytimes.com/2014/01/30/science/earth/climate-change-taking-toll-on-penguins-study-fins.html">http://www.nytimes.com/2014/01/30/science/earth/climate-change-taking-toll-on-penguins-study-fins.html</a> ]. Acessado em 17 de março de 2014.
<b>Novas mídias (blogs, sites ou outros trabalhos escritos)</b>	Allen L (2006). Anunciando os blogs PLOS. 1 de setembro de 2010 [citado em 17 de março de 2014]. In: PLOS Blogs [Internet]. São Francisco: PLOS 2006 - . [cerca de 2 telas]. Disponível em [ <a href="http://blogs.plos.org/plos/2010/09/announcing-plos-blogs/">http://blogs.plos.org/plos/2010/09/announcing-plos-blogs/</a> ].
<b>Teses de mestrado ou dissertações de doutorado</b>	Wells A (1999). Explorando o desenvolvimento do periódico acadêmico independente e eletrônico. Tese de mestrado. Universidade de Sheffield, Sheffield. Disponível em [ <a href="http://cumincad.scix.net/cgi-bin/works/Show?2e09">http://cumincad.scix.net/cgi-bin/works/Show?2e09</a> ].
<b>Bancos de dados e repositórios (Figshare, arXiv)</b>	Roberts SB (2013). Faixas de recursos do navegador de genoma QPX. Banco de dados: figshare [Internet]. Acessado em [ <a href="http://figshare.com/articles/QPX_Genome_Browser_Feature_Tracks/701214">http://figshare.com/articles/QPX_Genome_Browser_Feature_Tracks/701214</a> ].

## Material suplementar

Os autores podem usar quase qualquer descrição como o nome do item para um arquivo de material suplementar, desde que contenha um “s” e um número. por exemplo, “figura s1” e “figura s2”, “tabela s1” e “tabela s2” e assim por diante.

Os arquivos de material suplementar são publicados exatamente como fornecidos e não são copiados.

## Legendas de material suplementar

Liste as legendas do material suplementar no final do arquivo do manuscrito. Não envie legendas em um arquivo separado.

O número e o nome do arquivo são obrigatórios em uma legenda, e é altamente recomendável incluir também um título de uma linha ou uma legenda (para figuras).

## Exemplo de legenda

**Texto s1.** Título/Legenda é fortemente recomendado.

### Citações no texto

Exigimos que você cite material suplementar no texto do manuscrito. Se você citar informações de apoio no texto, as citações precisam estar em ordem numérica.

### Figuras e tabelas

Tabelas e figuras são citadas em letras maiúsculas, por extenso, não abreviadas e seguindo a ordem de citação no texto (ex.: figura 1, figura 2, figura 3, e assim por diante).

### Figuras

As ilustrações/figuras (fotografias, desenhos, diagramas e gráficos) devem estar cada uma em um único arquivo, numeradas em uma série consecutiva de algarismos arábicos na ordem em que são citadas no texto. As ilustrações devem ser enviadas como arquivos separados. Todas as ilustrações devem ser fornecidas em formato tiff (.tiff) em cores ou preto e branco. As imagens devem ser salvas como arquivos independentes e separados. A resolução da imagem deve ser de 300 a 600 dpi. Não incorpore imagens dentro do arquivo de texto. Indique a localização de cada figura no texto. Não esqueça de enviar a legenda em página separada.

Cite as figuras em ordem numérica crescente na primeira aparição no arquivo do manuscrito. Se alguma de suas figuras estiver sob direitos autorais, notifique o escritório da revista.

### Legendas das figuras

As legendas das figuras devem ser inseridas no texto do manuscrito, imediatamente após o parágrafo em que a figura é citada pela primeira vez (ordem de leitura). Não inclua legendas como parte dos próprios arquivos de figuras ou envie-os em um documento separado.

No mínimo, inclua o seguinte nas legendas de suas figuras:

- um rótulo de figura com algarismos arábicos. combine o rótulo de sua figura com o nome do arquivo carregado no envio (por exemplo, uma citação de figura de “figura 1” deve se referir a um arquivo de figura denominado “gmr número-fl.tif”).
- um título conciso e descritivo

A legenda também pode incluir uma legenda, conforme necessário.

## Tabelas

Cuidados especiais devem ser tomados para garantir que todas as tabelas estejam formatadas corretamente. Científico os símbolos usados devem estar em `symbol` ou `times new roman`. as tabelas devem ser numeradas consecutivamente (com algarismos arábicos) referidos por número no texto e desenhados para caber no tamanho da coluna ou página da revista. Use tabelas com células para separar colunas. Não use espaços, tabulações ou linhas verticais. Justifique à esquerda o título acima da tabela. Indique a localização de cada tabela no manuscrito.

Coloque cada tabela em seu arquivo de manuscrito diretamente após o parágrafo em que foi citada pela primeira vez (ordem de leitura). Não envie suas tabelas em arquivos separados.

As tabelas requerem um rótulo (por exemplo, “tabela 1”) e um breve título descritivo para ser colocado acima da tabela. Coloque legendas, notas de rodapé e outros textos abaixo da tabela.

## INFORMAÇÕES ADICIONAIS SOLICITADAS NA SUBMISSÃO

### Declaração de financiamento

Esta seção deve descrever as fontes de financiamento que apoiaram o estudo. Inclua os números de concessão relevantes e o url do site de qualquer financiador.

### Conflitos de interesse

O autor correspondente é solicitado a declarar, em nome de todos os autores, se há algum interesse financeiro, pessoal ou profissional que possa ser interpretado como tendo influenciado o estudo.

Quaisquer interesses conflitantes relevantes dos autores devem estar disponíveis para editores e revisores durante o processo de revisão e serão declarados nos artigos publicados.