



Escola de Ciências e Tecnologias

**Departamento de Química**

**Curso de Licenciatura em Bioquímica**

Caracterização molecular de genes de parasitismo do nemátode da madeira do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*, em interação com o hospedeiro

**Relatório de estágio**

**Realizado por:** Carolina Mendes Freitas

Orientadores: Doutora Margarida Espada

Doutora Cláudia Vicente

Évora

**2021**



Escola de Ciências e Tecnologias

**Departamento de Química**

**Curso de Licenciatura em Bioquímica**

Caracterização molecular de genes de parasitismo do nemátode da madeira do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*, em interação com o hospedeiro

**Relatório de estágio**

**Realizado por:** Carolina Mendes Freitas

Orientadores: Doutora Margarida Espada

Doutora Cláudia Vicente

Évora

**2021**

**“Este trabalho não inclui as observações do júri”**

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar quero expressar o meu agradecimento à Universidade de Évora por me proporcionar todas as condições para realizar este estágio, pela experiência académica e por todos os conhecimentos que me instruíram, tornando-se assim uma etapa inesquecível.

Às minhas orientadoras, a Doutora Margarida Espada e a Doutora Cláudia Vicente, pela sabedoria, paciência, simpatia, pelo grande apoio e atenção prestado e ainda o elevado sentido profissional e pelo estímulo na realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Nematologia, liderado pelo Professor Manuel Mota, (Instituto Mediterrâneo para a Agricultura, Ambiente e Desenvolvimento, MED, Universidade de Évora (UÉvora) e ao Departamento de Química da ECT-Universidade de Évora, pelo equipamento e suporte financeiros essenciais à realização deste trabalho.

Quero ainda agradecer a toda a minha família, e, em especial, à minha mãe pela oportunidade e apoio para a realização deste sonho, sempre com a sua força positiva e incentivando-me a crescer. Aos meus irmãos e cunhados pelo amor, pelo apoio em todos os momentos e por me mostrarem o valor de cada conquista, sem nunca desistirem de mim nem duvidarem das minhas capacidades. Ao meu namorado, por me apoiar e ajudar a seguir em frente sem nunca desistir.

Por fim, agradeço também a todos os amigos, mas principalmente aqueles que conheci ao longo destes três anos, não só pelas experiências fantásticas que vivemos em conjunto, como também pelo apoio, palavras de encorajamento e compreensão. À minha amiga Alexandra pelo apoio incondicional e carinho, mesmo sendo à distância.

## Índice

Agradecimentos.....	iii
Índice.....	iv
Índice de Figuras.....	vi
Índice de Tabelas.....	viii
Abreviaturas.....	ix
Resumo.....	x
Palavras-chave.....	x
Abstract.....	xi
Keywords.....	xi
1. Fundamento Teórico.....	12
1.1 Nemátodes fitoparasitas.....	12
1.2 <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> como agente causal da doença da murchidão do pinheiro.....	12
1.2.1 Biologia – ciclo de vida do <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> .....	14
1.3 A interação nemátode da madeira do pinheiro com o hospedeiro.....	15
1.3.1 Interação entre NMP e pinheiro-bravo.....	16
2. Problema e Objetivos.....	18
2.1. Problema.....	18
2.2. Objetivos gerais.....	18
2.3. Objetivos específicos.....	19
3. Metodologia.....	20
3.1 Estratégia.....	20
3.2 Procedimento experimental.....	22
3.2.1 Extração de DNA genómico de <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> .....	22
3.2.2 Análise preditiva dos genes candidatos de <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> .....	22
3.2.2.1 Validação dos genes candidatos por PCR.....	22
3.2.2.2 Eletroforese em gel de agarose.....	24
3.2.3 Clonagem direta em vetor <i>Gateway</i> .....	24

3.2.3.1	Preparação das placas para a reação de clonagem.....	24
3.2.3.2	Adição dos dATP's.....	25
3.2.3.3	Clonagem e transformação de células competentes.....	25
3.2.3.4	Confirmação da clonagem por PCR de colônia ( <i>Colony PCR</i> ).....	26
3.2.3.5	Extração do plasmídeo de clonagem - Miniprep.....	26
3.2.3.6	Sequenciação direta de Sanger.....	27
3.2.4	Avaliação da expressão dos genes candidatos em condições de stress oxidativo.....	27
3.2.4.1	Ensaio de Stress Oxidativo.....	27
3.2.4.2	Extração de RNA total e síntese de DNA complementar (cDNA).....	27
3.2.4.3	Análise de expressão dos genes por RT-PCR semi-quantitativo.....	28
3.2.5	Hibridação <i>in situ</i> dos genes candidatos de <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> ...	28
3.2.5.1	Síntese da sonda marcada com Digoxigenina (DIG).....	29
3.2.5.2	Hibridação <i>in situ</i> .....	30
3.2.6	Equipamentos.....	31
3.2.7	Reagentes.....	32
3.3	Diagrama de trabalho.....	33
4.	Resultados e Discussão.....	34
4.1	Análise preditiva de genes candidatos.....	34
4.2.	Validação dos genes que codificam taumatinas.....	36
4.3.	Clonagem do gene BXY0122100 em vetor de expressão.....	36
4.4	Ensaio de Stress Oxidativo.....	38
4.5	Hibridação <i>in situ</i> dos genes candidatos de <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> .....	39
5.	Conclusões.....	42
6.	Referências.....	43
ANEXOS.....		48
ANEXO 1	– Expressão preditiva dos genes taumatinas de <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> nas glândulas esofageais.....	49
ANEXO 2	– Preparação de Soluções para Hibridação <i>in situ</i> .....	49
ANEXO 3	– Análise preditiva dos domínios funcionais das proteínas em estudo....	50

## Índice de Figuras

**Figura 1** - O nemátode da madeira do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*. À esquerda, o macho; à direita, a fêmea. (Cortesia: Jon Eisenback, Virginia Tech, EUA).

**Figura 2** - Doença da murchidão do pinheiro causada pelo nemátode da madeira do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*. Na imagem podem ver-se pinheiros (*Pinus pinaster*, pinheiro-bravo) com sintomatologia grave (murchidão, com agulhas acastanhadas) e também árvores assintomáticas (com agulhas verdes). (Cortesia de Professor Manuel Mota; local: Autoestrada A6, Portugal).

**Figura 3** - Ciclo de vida de *Bursaphelenchus xylophilus* associado ao ciclo de vida de *Monochamus galloprovincialis*. (Adaptado de Vicente et al., 2021)

**Figura 4** - Interação molecular entre o nemátode e a planta hospedeira. Representação das diferentes proteínas envolvidas no parasitismo e a sua possível localização nas células do hospedeiro. As proteínas de parasitismo são produzidas nas glândulas esofágicas e secretadas nas células vegetais, pelo estilete (indicado como “stylet”). Diferentes tipos de proteínas de parasitismo estão ilustrados na imagem: enzimas que degradam a parede celular (CW), proteínas modificadoras de ciclo celular (NLS), enzimas que degradam proteínas do hospedeiro, como as proteases (UBQ); proteínas que mimetizam homólogos nas plantas (CLE). (Adaptado de Davis et al., 2004)

**Figura 5** - Posições das células das glândulas esofágicas no NMP (adulto). DG, glândula dorsal (assinalado a cor-de-laranja); M, bolbo médio; S, estilete; SVG, glândulas subventrais (assinaladas a branco). A DG tem um tamanho significativamente superior comparativamente às duas SVG. Barra de escala, 20 µm. (Adaptado de Espada et al., 2016a)

**Figura 6** - Validação dos genes em estudo por PCR e amplificação de sondas para fragmentos de Hibridação *in situ*. Os resultados foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Gel A: Amplificação do gene BXY0122100; Poço 1- Marcador de 1kb; 2- controlo negativo (sem gDNA); 3- amplificação a partir da amostra gDNA [35,2ng/µL]; 4- amplificação a partir da amostra [19,0ng/µL]. Gel B: Poço 1- Marcador de 1kb; 2- amplificação do gene BXY0431000 full length; 3- amplificação do fragmento do gene BXY0431000 para hibridação *in situ*; 4- amplificação do fragmento do gene BXY0431400 para hibridação *in situ*; 5- amplificação do gene BXY0431400 full length; 6- amplificação do fragmento do gene BXY0122000 para hibridação *in situ*. Gel C:

Producto de PCR amplificado do gene BXY0122100 e purificado; Poço 1- marcador de 1kb; Poço 2- produto de PCR purificado.

**Figura 7** - Clonagem do gene BXY0122100. Resultados da transformação em células competentes Mach1-T1 de: A- 100µL de pUC19 (vetor controlo) em LB+Amp; B- 100µL de suspensão bacteriana de pCR8/GW+BXY0122100 em LB+SPE; C- 50µL de suspensão bacteriana de pCR8/GW+BXY0122100 em LB+SPE. Os círculos vermelho e amarelo representam, respetivamente, colónias de pequenas e grandes dimensões que foram selecionadas para o colony PCR.

**Figura 8** - Resultados dos *colony* PCR de pCR8/GW+BXY0122100 analisados por eletroforese em gel de agarose. O Gel A corresponde ao *colony* PCR1, onde amplificamos o vetor com os *primers* universais M13F/M13R. Neste gel: Poço 1- Marcador de 1kb; Poço 2 e 4- clone 1 e 3 correspondentes a colónias grandes; Poço 3 e 5- clone 2 e clone 4 provenientes de colónias satélite. O Gel B corresponde ao *colony* PCR2, onde amplificamos o vetor com os *primers* M13F/*primer* específico do gene R: Poço 1,3: clones 1 e 3; Poço 2 e 4- clones 2 e 4; Poço 5- Marcador de 100pb.

**Figura 9** - Resultados do RT-PCR semi-quantitativo (SQ-RTPCR) analisados por eletroforese em gel de agarose. Alíquotas do produto da reação de SQ-RTPCR foi retirado ao final dos ciclos 15°, 19°, 23°, 27° e 30°. A- gene da Actina; B- gene BXY0122100; C- gene BXY0431000; D- gene BXY0431400; M- Marcador 100pb; C- Controlo; 15- 15mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 30- 30mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Figura 10** - Resultados de hibridação *in situ* dos genes BXY0431000 e BXY0431400. As imagens foram obtidas por microscopia óptica (ampliação 20x). Para cada gene utilizaram-se duas sondas: *sense* é a sonda de controlo (*primer forward*) e *anti-sense* é a sonda específica (*primer reverse*). Na ilustração à esquerda é possível ver identificadas as estruturas na região anterior do NMP.

## Índice de Tabelas

**Tabela 1** - Lista dos *primers* utilizados em todo o procedimento experimental. F- *forward*; R- *reverse*. Os genes *full length* correspondem ao ORF, ou seja, corresponde a todo o transcrito codificante.

**Tabela 2** - Resultados da análise preditiva realizada para os genes de parasitismo em estudo. A análise de similaridade de sequências e análise do domínio funcional das proteínas foi realizada pelos softwares BlastP e InterPro, respectivamente.

## Abreviaturas

AMP	Ampicilina
BXY	<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>
cDNA	DNA complementar
dATP	Desoxiadenosina trifosfato (nucleótido)
DIG	Digoxigenina
DMP	Doença da Murchidão do Pinheiro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FFN	Fileira Florestal Nacional
FPKM	<i>Fragments Per Kilobase of exon per million reads Mapped</i>
GC	<i>Glycoside hydrolases</i>
gDNA	DNA genómico
GST	Glutathione-S-transferase
GW	Gateway
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogénio
LB	Luria Bertani
NMP	Nemátode da Madeira do Pinheiro
NGS	Sequenciação de Nova Geração
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (região codificante do gene – transcrito)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pDNA	DNA plasmídico
PIB	Produto interno bruto
RNA	Ácido ribonucleico
RNAseq	Sequenciação de RNA
ROS	Sistema de stress oxidativo
RT-PCR	<i>transcriptase reversa polymerase chain reaction</i>
SOC	Variante de <i>Super Optimal Broth</i> (SOB)
SPE	Espectinomicina
SQ-RT-PCR	Semi-quantitativo RT-PCR
TBE	Tris-Borat-EDTA
UV	Ultra-violeta
V	Volts

## Resumo

O nemátode da madeira do pinheiro (NMP), *Bursaphelenchus xylophilus*, é um agente patogénico que causa graves danos a várias espécies de coníferas (em Portugal, pinheiro-bravo), tendo um grande impacto na indústria madeireira e nos ecossistemas florestais. Estudos anteriores do transcriptoma do NMP permitiram identificar genes que estão significativamente expressos durante a infeção do hospedeiro, entre os quais estão genes que codificam proteínas com domínio de taumatina. O objetivo principal deste estudo foi a caracterização molecular deste grupo de genes e compreender de que forma poderão participar no parasitismo do NMP. Para atingir os objetivos específicos, foram realizadas várias técnicas de biologia molecular tais como o PCR convencional, RT-PCR e o SQ-RT-PCR, clonagem, eletroforese em gel e sequenciação direta. O estudo funcional dos genes candidatos foi realizado através dos ensaios de stress oxidativo e hibridação *in situ*. A amplificação dos genes a partir de gDNA validou três genes no genoma do NMP – BXY0122100, BXY0431000 e BXY431400. Os genes codificam três proteínas com domínio funcional pertencente à família das taumatinas (IPR037176). A clonagem e sequenciação do gene candidato mais interessante - BXY0122100 - confirmou a sequência predita. A localização destes genes no corpo do NMP mostra que BXY0431400 apresentou, possível, expressão no intestino. O NMP sobrevive após 24h de exposição ao agente oxidante H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (a 15mM e a 30mM), havendo alteração da expressão dos três genes comparativamente ao controlo. Com este trabalho, concluiu-se que algumas taumatinas são expressas em diferentes tecidos do NMP o que poderá indicar diferentes funções. No geral, as taumatinas podem estar relacionadas com a metabolização de compostos de stress oxidativo e estar envolvidos na interação com a planta hospedeira.

## Palavras-chave

*Bursaphelenchus xylophilus*, doença da madeira do pinheiro, genes de parasitismo, taumatina, stress oxidativo, hibridação *in situ*.

## Abstract

The pinewood nematode (NMP), *Bursaphelenchus xylophilus*, is the pathogen that causes serious damage to several species of conifers (in Portugal, maritime pine), having a major impact on the wood industry and forest ecosystems. Previous studies of the NMP transcriptome have identified genes that are significantly expressed during host infection, among which are genes encoding proteins with a thaumatin domain. The main objective of this study was the molecular characterization of these group of genes and understand how they can participate in the parasitism of NMP. To achieve the specific objectives, several molecular biology techniques were performed such as conventional PCR, RT-PCR and SQ-RTPCR, cloning, gel electrophoresis and direct sequencing. The functional study of the candidate genes was carried out through the oxidative stress and *in situ* hybridization tests. Gene amplification from gDNA validated three genes in the NMP genome – BXY0122100, BXY0431000 and BXY431400. The genes encode three proteins with functional domain belonging to the thaumatin family (IPR037176). The cloning and sequencing of the most interesting candidate gene - BXY0122100 - confirmed the predicted sequence. The location of these genes in the NMP body shows that BXY0431400 is possibly, expressed in the intestine. NMP survives after 24 hours of exposure to the oxidative agent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (at 15mM and 30mM), and all three genes have a change in their expression compared to the control. With this study, we concluded that some thaumatins are expressed in different tissues of the NMP which may indicate different functions. In general, thaumatin may be related to the metabolization of oxidative stress compounds and may be involved in the interaction with the host plant.

## Keywords

*Bursaphelenchus xylophilus*, pine wilt disease, parasitism genes, thaumatin, oxidative stress, *in situ* hybridization.

## 1. Fundamento Teórico

### 1.1 Nemátodes fitoparasitas

Os nemátodes pertencem ao *Phylum Nematoda* e caracterizam-se pela forma do corpo vermiforme, não-segmentado e alongado estando totalmente revestido por uma cutícula resistente. Os nemátodes estão dispersos por todo o mundo, ocupando variados nichos ecológicos desde o ambiente marinho aos solos e podem adaptar-se às mais diferentes condições ambientais e de stress. Representam 4 em cada 5 animais estando descritas, até ao presente, mais de 25000 espécies (Perry & Moens, 2011; Blaxter & Koutsovoulos, 2015). A maioria dos nemátodes são de vida livre, como o modelo científico *Caenorhabditis elegans*, e outras espécies, que podem ser usadas como bioindicadores em monitorização ambiental (wormbook.org; Corsi *et al.*, 2015). Contudo, muitos nemátodes evoluíram para se tornarem parasitas de animais e plantas (florestais e agrícolas) com interesse económico (Perry & Moens, 2011; Blaxter & Koutsovoulos, 2015).

### 1.2 *Bursaphelenchus xylophilus* como agente causal da doença da murchidão do pinheiro

O nemátode da madeira do pinheiro (NMP), *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhrer, 1934, Nickle, 1970) (Figura 1), pertence ao género *Bursaphelenchus* (Fuchs, 1937), cuja presença está associada a diferentes espécies de coníferas. O NMP é um nemátode endoparasita migratório e é o responsável pela doença da murchidão do pinheiro (DMP) (Figura 2), que afeta algumas espécies do género *Pinus*. O NMP é originário da América do Norte onde as espécies de coníferas endémicas têm tolerância ou resistência ao nemátode. No início do século XX, o nemátode foi introduzido no continente Asiático (Japão) onde causou graves danos nas florestas de coníferas. Nas décadas seguintes, dispersou-se para outros países como China, Coreia e Taiwan, o que contribuiu para o impacto negativo nas florestas asiáticas e economia madeireira (Vicente *et al.*, 2012). No ano de 1999, o NMP foi pela primeira vez detetado na Europa, na Península de Setúbal, em Portugal (Mota *et al.*, 1999). Na década seguinte, o NMP dispersou pelo centro do território continental, Ilha da Madeira (Fonseca *et al.*, 2012), e em Espanha (Robertson *et al.*, 2011). O NMP está classificado no Top 10 de nemátodes fitoparasitas com maior impacto económico e ecológico, sendo uma das maiores ameaças para as florestas de coníferas mundiais (Vicente *et al.*, 2012; Jones *et al.*, 2013). Na Europa, as florestas cobrem 44% do território e muitas das espécies de

coníferas são suscetíveis ao NMP (como por exemplo o pinheiro silvestre, *Pinus sylvestris*). Nas regiões afetadas as árvores podem morrer dentro de um ano e os danos causados são extensos. O impacto negativo nos ecossistemas florestais (as regiões afetadas levam décadas para recuperar) e na indústria madeireira e fileira do pinho é extenso e levam a perdas avultadas (Vicente *et al.*, 2012).



**Figura 1** - O nemátode da madeira do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*. À esquerda, o macho; à direita, a fêmea. (Cortesia: Jon Eisenback, Virginia Tech, EUA).

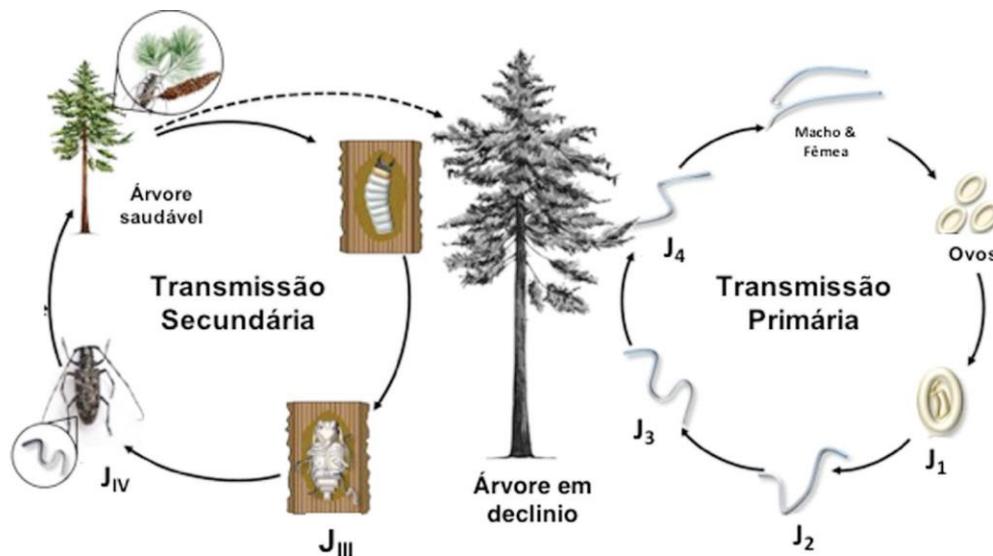
Na Europa, o NMP é considerado organismo de quarentena A2 e consequentemente, há restrições e sanções económicas para a circulação de produtos provenientes de áreas afetadas (Vicente *et al.*, 2012; Sousa, *et al.*, 2015; EPPO, 2018). Em Portugal, o pinheiro-bravo (*Pinus pinaster*) é importante na atividade económica da indústria madeireira, na medida em que ocupa mais de um milhão de hectares das florestas nacionais, sendo alvo de vários estudos direcionados para o seu melhoramento genético. Existem outras espécies suscetíveis à infeção, como *P. nigra* (Inácio *et al.*, 2015). Contudo, o *P. pinaster* é a espécie mais afetada devido à sua grande abundância (Santos & Vasconcelos, 2011). Em 2018, as exportações de madeira e afins foram de 4,5 mil milhões de euros, o que demonstra o seu elevado reconhecimento e notoriedade internacional (Marques, 2019).



**Figura 2** - Doença da murchidão do pinheiro causada pelo nemátode da madeira do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*. Na imagem podem ver-se pinheiros (*Pinus pinaster*, pinheiro-bravo) com sintomatologia grave (murchidão, com agulhas acastanhadas) e também árvores assintomáticas (com agulhas verdes). (Cortesia de Professor Manuel Mota; local: Autoestrada A6, Portugal).

### 1.2.1 Biologia – ciclo de vida do *Bursaphelenchus xylophilus*

A DMP é o resultado da interação entre três fatores: o nemátode parasita, o inseto-vetor e a árvore hospedeira (Figura 3). De forma a controlar esta doença e travar a sua propagação, tem-se feito muitos esforços estudando o NMP para melhor compreender o seu ciclo de vida e parasitismo.



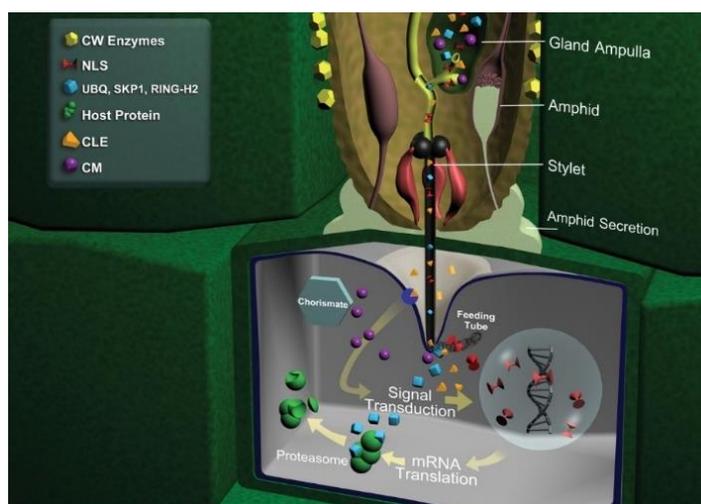
**Figura 3** - Ciclo de vida de *Bursaphelenchus xylophilus* associado ao ciclo de vida de *Monochamus galloprovincialis*. (Adaptado de Vicente *et al.*, 2021)

Este nemátode tem duas características únicas dentro dos nemátodes fitoparasitas: é transportado pelo cerambicídeo *Monochamus galloprovincialis* de um hospedeiro para outro; e tem capacidade de alternar entre duas formas de alimentação - fitófago e micófago (Mota *et al.*, 1999; Vicente *et al.*, 2012; Futai, 2013). O nemátode

entra no hospedeiro saudável pelas feridas causadas pelo inseto-vetor e alimenta-se das células do parênquima dos canais de resina, no córtex e no xilema (fase parasítica). Como consequência da alimentação e movimentação, provoca a redução no fluxo de água e cessação do fluxo de resina, causando embolismos no sistema vascular da planta. A árvore liberta compostos polifenólicos, terpenóides, espécies reativas de oxigênio e peróxidos lipídicos durante as fases iniciais da infecção como parte de uma forte resposta de defesa. Nos estados mais avançados da doença, o nemátode tem a capacidade de se tornar micófago, alimentando-se de fungos endofíticos das árvores em declínio (fase micófaga). Com o grande aumento da população de nemátodes, o transporte de água através da árvore fica comprometido, e os sintomas exteriores são a vermelhidão e murchidão das agulhas como resultado do colapso da fotossíntese terminando num declínio rápido geral (dentro de um ano) (Vicente *et al.*, 2012). Após esta fase o nemátode entra numa fase de sobrevivência, - a larva de *Dauer* - que é atraída para as câmaras pupais dos insetos. Quando os insetos adultos emergem das árvores levam os nemátodes no interior do seu corpo, transportando-os assim para novas árvores saudáveis (Moens & Perry, 2009; Jones *et al.*, 2008; Vicente *et al.*, 2012).

### **1.3 A interação nemátode da madeira do pinheiro com o hospedeiro**

As interações entre a planta e nemátode são mediadas por proteínas de parasitismo, que modificam o hospedeiro para o benefício do parasita. Muitas destas proteínas poderão ser produzidas em tecidos secretores dos nemátodes, como as glândulas esofágicas, e secretadas dentro da planta hospedeira através do estilete (Figura 4). O estudo das proteínas de parasitismo foi revolucionado pelo aparecimento da Sequenciação de Nova Geração (NGS), que permitiu sequenciar genomas e transcriptomas completos dos parasitas e hospedeiros. Muitas destas proteínas de parasitismo foram identificadas como altamente expressas durante a infecção. São exemplo, proteínas que são capazes de degradar a parede celular da planta, suprimir defesas e manipular as vias de sinalização do hospedeiro. O estilete (Figura 4), estrutura semelhante a uma agulha, tem também um papel mecânico importante porque permite perfurar a parede celular vegetal (rígida) durante a migração no tecido vegetal. No entanto, o estilete também é usado para se alimentar e entregar as proteínas sendo estas consideradas como adaptações evolutivas facilitando o parasitismo (Davis *et al.*, 2004; Haegeman *et al.*, 2012).

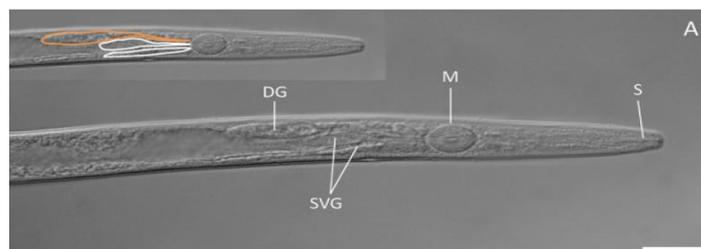


**Figura 4** - Interação molecular entre o nemátode e a planta hospedeira. Representação das diferentes proteínas envolvidas no parasitismo e a sua possível localização nas células do hospedeiro. As proteínas de parasitismo são produzidas nas glândulas esofágicas e secretadas nas células vegetais, pelo estilete (indicado como "stylet"). Diferentes tipos de proteínas de parasitismo estão ilustrados na imagem: enzimas que degradam a parede celular (CW), proteínas modificadoras de ciclo celular (NLS), enzimas que degradam proteínas do hospedeiro, como as proteases (UBQ); proteínas que mimetizam homólogos nas plantas (CLE). (Adaptado de Davis *et al.*, 2004)

### 1.3.1 Interação entre NMP e pinheiro-bravo

Os mecanismos de parasitismo subjacentes à interação entre *B. xylophilus* e o seu hospedeiro permanecem ainda por esclarecer. Do lado da planta hospedeira, à medida que ocorre a migração do NMP nos tecidos, a resposta hipersensitiva é ativada, que resulta na libertação de compostos fenólicos, síntese de toxinas e fitoalexinas e produção de oleoresina e substâncias tóxicas (Santos & Vasconcelos, 2011). Estudos recentes (Baldo *et al.*, 2010) demonstram que estes mecanismos de defesa contra agentes patogénicos ocorrem nas primeiras horas após infeção (Santos & Vasconcelos, 2011). O sistema vascular pode ficar bloqueado pela resina secundária originada das células de parênquima danificadas por nemátodes e, também, a cativação causada como resultado do aumento da produção de compostos de defesa voláteis (Jones *et al.*, 2008; Faria *et al.*, 2015). Em estudos anteriores, com recurso a sequenciação de RNA (RNAseq) (transcriptoma do nemátode), foram identificados os genes diferencialmente expressos quando o NMP infeta a planta (fase parasítica) comparativamente ao controlo (fase pré-parasítica) (Espada *et al.*, 2016a; Tsai *et al.*, 2016). Posteriormente, foi também sequenciado um tecido especializado no parasitismo - as glândulas esofágicas - e identificados um novo conjunto de genes potencialmente envolvidos no parasitismo (Espada *et al.*, 2018). Durante a interação com o seu hospedeiro, o NMP possui

diferentes tipos de proteínas que são expressas nas glândulas esofágicas e que, conseqüentemente, são secretadas diretamente nas células da planta hospedeira que estão relacionadas com o parasitismo. A presença do sinal peptídico (SP) e ausência de domínio transmembranar foram dois dos fatores de seleção para os potenciais candidatos ao parasitismo (para além da expressão diferencial durante a infeção). São exemplos, as proteínas que degradam a parede celular (por exemplo, beta 1,4-endoglucanases, GH45) e proteínas de digestão (peptidases, lisozimas) (Jones *et al.*, 2008; Espada *et al.*, 2016a). Muitas outras proteínas caracterizadas poderão ter a função de defesa do NMP contra as defesas do hospedeiro como por exemplo, as enzimas de destoxificação como a glutathione S-transferase (Espada *et al.*, 2016b) que ajuda o NMP a degradar compostos terpenóides produzidos pela planta, as peroxiredoxinas (Li *et al.*, 2016) e as catalases (Vicente *et al.*, 2015) que serão capazes de degradar o sistema de stress oxidativo (ROS). No estudo das glândulas esofágicas (Figura 5), foram identificadas outras proteínas com sinal peptídico e com grande abundância nestes tecidos: o caso das taumatinas, das toxinas (*venon-allergen*) entre outras (Espada *et al.*, 2018). A análise dos dados de NGS revelou também novas proteínas que poderão estar envolvidas no parasitismo, mas o seu domínio funcional não tem qualquer similaridade com outros descritos nas bases de dados públicas, até ao presente. São uma oportunidade para identificar e caracterizar novos genes de parasitismo.



**Figura 5-** Posições das células das glândulas esofágicas no NMP (adulto). DG, glândula dorsal (assinalado a cor-de-laranja); M, bolbo médio; S, estilete; SVG, glândulas subventrais (assinaladas a branco). A DG tem um tamanho significativamente superior comparativamente às duas SVG. Barra de escala, 20 µm. (Adaptado de Espada *et al.*, 2016a)

## **2. Problema e Objetivos**

### **2.1. Problema**

Existem vários países que fazem crescer a sua economia através da indústria madeireira, como é o caso de Portugal. A Fileira Florestal Nacional (FFN) é composta por várias empresas cujo trabalho é a exportação de madeiras e afins. A FFN reflete uma grande importância em termos económicos, contribuindo significativamente para o Produto Interno Bruto (PIB) (Marques, 2019), com a exportação de madeira, cortiça, papel, pasta e produtos resinosos, sendo que esta madeira é de enorme qualidade para que possa ser exportada para países como Espanha, Reino Unido e França. Em 2018, as exportações totais desta fileira foram de 4,5 mil milhões de euros, o que demonstra o seu elevado reconhecimento e notoriedade internacional (Cardoso & Quelhas, 2014).

Para que esta madeira seja exportada tem de ter uma qualidade de excelência, ou seja, não pode conter nemátodes fitoparasitas, que comprometem a qualidade da mesma. Caso a madeira exportada esteja contaminada com o NMP, corre o risco de contaminar árvores potencialmente suscetíveis noutros países, causando a dispersão de um agente patogénico de quarentena (EPPO, 2018) e Portugal incorre em embargos ou sanções nas exportações. Por este motivo, toda a madeira exportada tem um selo de seleção que comprova a sua qualidade. Esta doença tem um impacto negativo na economia portuguesa e, por isso, são necessários mais estudos sobre o mecanismo de parasitismo que poderão levar a novas soluções para o seu controlo (Cardoso & Quelhas, 2014).

O objetivo deste estudo visa caracterizar alguns genes do NMP e qual a sua função no parasitismo. Se compreendemos como o NMP interage molecularmente com o seu hospedeiro poderemos encontrar novas soluções para travar a DMP e a sua propagação.

### **2.2. Objetivos gerais**

Este estudo teve como objetivo caracterizar as proteínas do NMP que codificam o domínio funcional da taumatina e compreender a sua resposta ao stress oxidativo.

### **2.3. Objetivos específicos**

#### Conhecer e compreender:

- A importância económica da madeira do pinheiro;
- A importância ecológica e económica do controlo de fitoparasitas;
- Protocolos experimentais para amplificar e analisar os genes do NMP, a partir de diferentes ácidos nucleicos;
- Protocolo experimental *in vitro* para testar as respostas do NMP ao stress oxidativo;
- Protocolo experimental *in situ* para processo de hibridação de sondas nos tecidos do NMP;
- Função dos genes candidatos do NMP no contexto do parasitismo.

#### Dar valor:

- A fundamentos sobre os diversos métodos na execução de procedimentos;
- Aos cuidados de manuseamento e segurança dos reagentes, equipamentos e materiais utilizados;
- Regras de segurança relativos aos reagentes e ao manuseamento dos equipamentos.

#### Aplicar:

- Técnicas de biologia molecular e métodos para estudar genes de parasitismo;
- Conhecimentos previamente adquiridos sobre manuseamento do material, das regras de segurança, realização dos protocolos experimentais e tratamento/análise de dados e discussão de resultados;
- *Software* adequados à análise preditiva de genes e proteínas.

### 3. Metodologia

#### 3.1 Estratégia

Local de realização: Laboratório de Nematologia (Pólo da Mitra), Universidade de Évora.

Apoio Financeiro: Verbas próprias do Laboratório de Nematologia

Duração: 1 semestre letivo

Modelo Biológico: Nemátode da madeira do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*, isolado BxPt38MC. O isolado é inoculado em fungo *Botrytis cinerea* (não-esporulado) previamente crescido em sementes de cevada, onde se multiplica durante 10 dias a 25°C. O isolado é mantido em cultura no Laboratório de Nematologia, Pólo da Mitra, Universidade de Évora.

#### Ensaios:

- Clonagem, transformação e sequenciação de Sanger (sequenciação direta)
- Hibridação *in situ*
- Stress Oxidativo
- SQ-RTPCR

#### Parâmetros analisados:

- Amplificação dos genes em estudo no DNA genómico (gDNA)
- Amplificação dos transcritos dos genes no DNA complementar (cDNA)
- Tamanho do fragmento obtidos e análise das suas sequências
- Hibridação das sondas nos tecidos dos nemátodes
- Quantificação da concentração dos ácidos nucleicos (DNA, RNA)
- Reação ao peróxido de hidrogénio
- Análise qualitativa da expressão dos transcritos dos genes
- Crescimento bacteriano em placa com antibiótico de seleção
- Observação microscópica da localização dos transcritos em estudo nos tecidos dos nemátodes
- Predição dos domínios funcional de proteínas e a sua caracterização
- Análises de sequências

#### Técnica utilizadas:

- Extração de DNA genómico
- Extração de RNA total

- Síntese da cadeia simples de cDNA
- Quantificação de ácidos nucleicos com fluorómetro
- Amplificação de fragmento por PCR
- Amplificação de fragmento por PCR com transcriptase reversa (RT-PCR)
- Eletroforese horizontal em gel de agarose
- Clonagem de gene em vetor de clonagem com Topoisomerase e transformação em células competentes
- Extração de DNA plasmídico (pDNA) de células bacterianas (Mini-prep)
- Quantificação relativa da expressão dos genes por RT-PCR semi-quantitativo (SQ-RT-PCR)
- Síntese de sondas com incorporação de digoxigenina (DIG)
- Reação de hibridação *in situ* das sondas de DIG nos nemátodes fixados
- Preparação e concentração de nemátodes
- Análise preditiva com recurso a *softwares* disponíveis em sítios da internet.

## 3.2 Procedimento experimental

### 3.2.1 Extração de DNA genômico de *Bursaphelenchus xylophilus*

De uma suspensão de nemátodes, pipetou-se 400µL para dois microtubos de 1,5mL. Os microtubos foram centrifugados a 10000rpm durante 5min com o objetivo de concentrar os nemátodes e eliminar a água da suspensão. O sobrenadante foi dispensado e o *pellet* lavado com H<sub>2</sub>O destilada autoclavada, repetindo uma vez mais o passo da centrifugação durante mais 3min. O sobrenadante foi de novo removido. A extração de DNA genômico (gDNA) do *B. xylophilus* foi efetuada com o kit Purelink Genomic DNA. Ao *pellet* de nemátodes, adicionou-se 180µL de tampão de digestão/lise (reagente do Kit) e macerou-se manualmente com ajuda de um *micropestle* (para tubos de 1,5mL). Adicionou-se 2µL de Proteinase K. A maceração manual juntamente com a lise química permite quebrar a cutícula e os tecidos dos nemátodes, facilitando a obtenção do DNA. Os microtubos foram colocados no termobloco (banho seco) durante 30 minutos a 55°C, com agitação. A partir daqui seguiram-se as instruções do fabricante. O gDNA do nemátode foi quantificado com o fluorómetro Qubit™ 4 seguindo as especificações do equipamento. Inicialmente preparou-se amostras standard para calibração do equipamento, juntando 10µL das concentrações 0ng/µL e 100 ng/µL a 190µL do reagente de trabalho. Para as amostras de DNA extraídas, adicionou-se 1µL de DNA a 199µL do reagente, perfazendo um volume total de 200µL. As amostras foram homogeneizadas por vórtex, incubadas durante 2 minutos, e quantificadas no fluorómetro.

### 3.2.2 Análise preditiva dos genes candidatos de *Bursaphelenchus xylophilus*

Neste estudo foram caracterizados quatro genes candidatos de *B. xylophilus*: BXY0122000, BXY0122100, BXY0431000 e BXY0431400. Estes genes foram identificados no transcriptoma das glândulas esofágicas de *B. xylophilus* (Anexo 1) (Espada *et al.*, 2018). As sequências estão disponíveis na versão anotada do genoma de *B. xylophilus* (Bio Project PRJEA64437) no software InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>; Blum *et al.*, 2020).

#### 3.2.2.1 Validação dos genes candidatos por PCR

A amplificação dos genes foi realizada pela técnica de PCR (*Polymerase chain reaction*) e os genes amplificados a partir do gDNA do NMP com os oligonucleótidos (*primers*) específicos para cada gene, descritos na Tabela 1. Os transcritos foram validados a partir do cDNA do NMP. As soluções de trabalho dos *primers* foram

preparadas a partir das soluções stock (com concentração de 100mM) e as sequências estão indicadas na Tabela 1. O programa de reação de PCR foi realizado de acordo com as condições da Taq DNA polimerase - NZY Taq II e é o seguinte: 6,25µL de NZYTaq II 2x green master mix, 1,25mM de cada *primer forward* e *reverse*; 38ng de DNA genómico. A temperatura de *annealing* específica para cada gene foi calculada de acordo com a temperatura de *melting* do par de *primers* (tabela 1). As reações de amplificação por PCR foram realizadas no termociclador, que automatiza o processo de amplificação de uma sequência específica de DNA a partir de uma pequena amostra, sendo rápido e simples. Em detalhe, o programa de reação de PCR utilizada consistiu em ciclos de temperaturas, iniciando pela desnaturação inicial das cadeias de DNA a 95°C durante 3min, seguindo-se 30 ciclos de amplificação do DNA. Durante os ciclos, ocorre a desnaturação do DNA (95°C), hibridação (*annealing*) dos *primers* (para cada gene, está indicado na tabela 1) e extensão (72°C), cada uma com uma duração de 30s. Por fim, ocorre a extensão final de 5 minutos a 72°C, temperatura específica da Taq DNA polimerase utilizada (NZYTaq II green, NZYTech).

**Tabela 3** - Lista dos *primers* utilizados em todo o procedimento experimental. F- *forward*; R- *reverse*. Os genes *full length* correspondem ao ORF, ou seja, corresponde a todo o transcrito codificante.

Identificação dos Genes	Sequências de <i>primers</i> (5'-3')	Temperatura de <i>annealing</i> (°C)	Tamanho esperado do fragmento (pb)
BXY0122100 ( <i>full length</i> )	F→ ACCATGCACTCAACCACACTGGT R→ GAAAGTGGCATCGGATTG	50	894
BXY0431000 ( <i>full length</i> )	F→ ACCATGGACACTTATGGTGGATATACG R→ AGGACAGTAGATGACGTAGAA	50	390
BXY0431000 (hibridação <i>in situ</i> )	F→ ACCACACTCGGTTGAGTTC R→ TTGCGCTGGTACAAGTCAAG	50	180
BXY0431400 ( <i>full length</i> )	F→ ACCATGTCTACTGAATGTTTCRACAACC R→ GCAGAAGTACAAGTCGAACG	53	381
BXY0431400 (hibridação <i>in situ</i> )	F→ CACTTGCCGAGTTCTCCTTC R→ ACGT5GCCTCCAGTTCTCACT	53	198
BXY0122000 (hibridação <i>in situ</i> )	F→ ACGTCGTTCCGGAGATTATG R→ TGTGGATGTCTTGTGTCGTCGT	50	218
BXYact	F→ CACATCTGTTGGAAGGTGGAC R→ CGAGAAGTCCTATGAACTTC	50	
M13	F→ GTAAAACGACGGCCAG R→ CAGGAAACAGCTATGAC	50	

### 3.2.2.2 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel permite visualizar os ácidos nucleicos e proteínas separados de acordo com o seu peso molecular. Baseia-se no princípio de que uma molécula com carga migra quando colocado num campo elétrico. A proporção de migração depende da carga, tamanho do fragmento e corrente elétrica aplicada. Para os ácidos nucleicos usa-se uma matriz de gel de agarose feita com diferentes concentrações de acordo com o tamanho dos fragmentos a analisar. Durante a preparação do gel de agarose é usado um agente intercalante para coloração derivado de brometo de etídio, como o GreenSafe. A visualização é feita por um transiluminador com radiação UV. Para visualizar os produtos de PCR, RT-PCR e SQ-RT-PCR amplificados utilizou-se a eletroforese de gel de agarose. Preparou-se o gel de agarose a 1%, juntando num frasco Erlenmeyer 0,4g de agarose com 40mL de TBE1X. A mistura é homogeneizada através de aquecimento no microondas. Posteriormente, adicionou-se o agente intercalante GreenSafe Premium. Colocou-se a agarose no berço de eletroforese, posicionou-se o pente e deixou-se solidificar durante cerca de 30min. Adicionou-se o berço com o gel de agarose sólido numa tina horizontal de eletroforese submergindo em TBE 1X. Em cada poço, aplicam-se 10µL de cada amostra juntamente com o *loading dye* e num dos poços aplica-se o 4µL do marcador molecular de DNA. A tina de eletroforese foi ligada a um gerador de corrente elétrica a uma intensidade de 90V (volts) durante 40min. Após terminar a corrida, observou-se no transiluminador com sistema de fotodocumentação. Após verificação da amplificação, purificou-se o produto de PCR com o kit QIAquick PCR Purification, seguindo as instruções do mesmo.

### 3.2.3 Clonagem direta em vetor *Gateway*

#### 3.2.3.1 Preparação das placas para a reação de clonagem

O meio *Luria Bertani* agar (LB) foi derretido por aquecimento, deixando-se arrefecer até aproximadamente 45°C à temperatura ambiente. Na câmara de fluxo laminar, adicionou-se 250µL de antibiótico espectinomicina 100mg/mL (SPE) para uma concentração final de 100ug/mL, homogeneizando-se suavemente para evitar a formação de bolhas. Distribuiu-se o meio com o antibiótico pelas placas de *Petri*, aproximadamente 20mL, e deixou-se solidificar. As placas foram identificadas com data e meio para posterior utilização.

### 3.2.3.2 Adição dos dATP's

Foi necessário inserir o nucleótido dATP nas extremidades do fragmento a clonar para encaixar o fragmento no plasmídeo de clonagem, pois a Taq anterior produziu produtos de PCR *blunt* (sem as extremidades A). A reação de PCR foi realizada de acordo com as condições da TopTaq com 0,1μL de TopTaq (5U/μL), 2μL de tampão TopTaq 10x, 0,8μL de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0,4μL de dATP (10mM), 6μL de produto de PCR purificado de BXY0122100, perfazendo-se um volume final de 10μL com DEPC-treated H<sub>2</sub>O. As reações foram incubadas num termociclador programado para 72°C durante 10min, reação de extensão final do PCR convencional. Após este passo, o produto foi utilizado imediatamente na reação de clonagem.

### 3.2.3.3 Clonagem e transformação de células competentes

A clonagem do produto de PCR foi realizada com o kit de clonagem pCR8/GW/TOPO. Num tubo de 0,5mL, adicionou-se 0,5μL de Vetor pCR8 TOPOisomerase, 1μL de *salt solution* diluída 4x e 4μL de produto de PCR com os nucleótidos A's adicionados, perfazendo-se um volume final de 6μL com dH<sub>2</sub>O. Agitou-se gentilmente e incubou-se à temperatura ambiente durante 30min. De seguida, colocou-se a reação de clonagem no gelo e procedeu-se à transformação de células bacterianas quimicamente competentes com o produto de clonagem. Neste estudo foram utilizadas as *Escherichia coli* One Shot Mach1 – T1 *Chemically Competent*, armazenadas a -80°C, descongeladas em gelo. Adicionou-se 2μL do produto de reação de clonagem (pCR8/GW + BXY0122100) em 25μL de células competentes, fazendo-se igualmente uma clonagem controlo com 2μL do vetor comercial pUC19 em 25μL de células competentes. As células foram incubadas no gelo durante 30min e, logo de seguida, realizou-se um choque térmico a 42°C durante 30s, colocando-se imediatamente no gelo. Adicionou-se 250μL de meio SOC a cada tudo de células transformadas e incubou-se, horizontalmente, a 37°C durante 1h30min, com agitação (100 rotações por minuto, rpm). Após esse tempo, 50μL e 100μL da suspensão bacteriana transformada com PCR8/GW + BXY0122100 foram espalhadas com esferas de vidro esterilizadas em placas de LB+SPE 100μg/mL. Para o vetor controlo foi espalhado 100μL da suspensão bacteriana com o vetor de controlo pUC19 em placas de LB+Ampicilina100μg/mL. As placas de *Petri* foram seladas com parafilme e incubadas na estufa a 37°C durante a noite.

#### 3.2.3.4 Confirmação da clonagem por PCR de colónia (*Colony* PCR)

Após o crescimento durante a noite, foram obtidas colónias de células transformadas. Para comprovar que a construção pCR8+BXY0122100 está presente nos plasmídeos foram picadas as colónias das placas, após uma noite.

De seguida, para cada clone, foram realizados dois PCR (*colony* PCR): PCR1 e PCR2. O PCR1 utiliza os *primers* M13F/M13R (Tabela 1) para verificar se o nosso produto estava inserido no vetor TOPOisomerase. O PCR2 utiliza o *primer* M13F e o *primer* BXY0122100 R para verificar se estava inserido de 5' – 3', ou seja, em *frame*. As reações dos *colony* PCR foram realizados de acordo com as condições da Taq DNA polimerase - NZY Taq II e é o seguinte: 10µL de NZYTaq II 2x green master mix, 0,3 mM do par de *primers* (sendo os *primers* utilizados diferentes em cada PCR) e 2µL de colónia (satélite e grande). A reação de PCR decorreu da seguinte forma: desnaturação inicial a 95°C durante 5min, seguindo-se 30 ciclos de amplificação do DNA (desnaturação do DNA (95°C) durante 45s, hibridação dos *primers* (50°C) durante 30s e extensão (72°C) durante 1min). A reação terminou com a extensão final de 5min a 72°C. A análise do resultado foi feita em eletroforese em gel de agarose a 1% com o marcador de 1Kb. Correram-se as amostras a 80V durante 40min e de seguida observou-se no transiluminador com sistema de fotodocumentação.

#### 3.2.3.5 Extração do plasmídeo de clonagem - Miniprep

A miniprep é o método de extração do DNA plasmídico (pDNA) das células bacterianas. Para os clones positivos de pCR8+BXY0112100, selecionados pelo *colony* PCR, foi crescido durante uma noite as bactérias transformadas em LB+SPE 100µg/mL, a 37°C a 100rpm. No dia seguinte, foram adicionados 500µL de glicerol a 60% (v/v) a 500µL da suspensão bacteriana. Os stocks correspondentes a cada clone foram guardados a -80°C. Para a extração do pDNA, 3mL da suspensão bacteriana foram centrifugados a 13000rpm durante 30s. Foi retirado o sobrenadante e seguiram-se as instruções do kit NZYMiniprep. O pDNA com o gene de interesse foi eluído no tampão de eluição e a sua concentração foi aferida pelo fluorómetro Qubit™ 4. Por fim, o pDNA obtido foi analisado por eletroforese em gel de agarose (a 1%), posteriormente visualizados no transiluminador com sistema de fotodocumentação. O marcador de DNA utilizado foi de 1Kb.

### 3.2.3.6 Sequenciação direta de Sanger

O pDNA dos clones do gene BXY0122100 foram enviados para sequenciação direta na empresa STABVIDA (Lisboa, Portugal) para confirmação da inserção do gene clonado. Os *primers* utilizados para a sequenciação foram M13F/M13R, descritos na Tabela 1. Cada clone foi sequenciado no sentido 5' para 3' e 3' para 5'. A análise das sequências obtidas foi realizada no programa Bioedit (Hall, 1999).

## 3.2.4 Avaliação da expressão dos genes candidatos em condições de stress oxidativo

### 3.2.4.1 Ensaio de Stress Oxidativo

O ensaio de stress oxidativo *in vitro* pretende ver qual a resposta dos genes candidatos à presença de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) (Vicente *et al.*, 2015). Foram preparadas duas soluções stock de  $H_2O_2$  em duas concentrações diferentes: 30mM (adicionou-se 31 $\mu$ L de  $H_2O_2$  (3% p/p, comercial) a 969 $\mu$ L  $dH_2O$  para fazer uma concentração de 15mM); 60mM (adicionou-se 61 $\mu$ L  $H_2O_2$  (3% p/p, comercial) a 939 $\mu$ L de  $dH_2O$  para fazer uma concentração de 30mM). Os nemátodes (em todos os estádios de desenvolvimento), previamente extraídos como anteriormente referido, foram centrifugados durante 10min a 7830rpm à temperatura ambiente para se poder estimar a concentração dos mesmos na lupa (cerca de 281 nemátodes em 50 $\mu$ L de  $H_2O$ ). Numa placa de 96 poços (Orange Scientific), o ensaio foi preparado da seguinte forma: i) para a condição controlo, a cada poço foram adicionados 50 $\mu$ L de nemátodes juntamente com 50 $\mu$ L de  $H_2O$ ; ii) para o tratamento com 15mM de  $H_2O_2$  foi adicionado 50 $\mu$ L da solução de 30mM e 50 $\mu$ L de nemátodes e, iii) para o tratamento com 30mM de  $H_2O_2$ , 50 $\mu$ L de nemátodes juntamente com 50 $\mu$ L de  $H_2O_2$  a uma concentração de 60mM (ficando com uma solução a 30mM). Para cada tratamento e controlo foram feitas dez réplicas. A placa foi tapada e selada com parafilme (Parafilm) e o ensaio decorreu durante 24 horas à temperatura ambiente, sem agitação. Após as 24 horas, verificou-se na lupa o estado (fenótipo) dos nemátodes. O conteúdo das 10 réplicas de cada tratamento foi transferido para microtubos de 1,5mL e guardados a  $-20^\circ C$  até utilização posterior.

### 3.2.4.2 Extração de RNA total e síntese de DNA complementar (cDNA)

O RNA total dos nemátodes para cada uma das condições (controlo, 15mM e 30mM) foi extraído com o RNeasy mini Kit. O RNA foi limpo de gDNA através do kit RNase-Free DNase Set durante o protocolo de extração do RNA e de acordo com o

fabricante. Por fim, quantificou-se o RNA total no Qubit™ 4 para verificar uma concentração suficiente para prosseguir a síntese da cadeia de cDNA. O cDNA foi sintetizado a partir de 100ng de RNA total de acordo com o protocolo descrito abaixo. Para a síntese de cDNA, utilizou-se o kit SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR, com 3 condições: controlo, 15mM e 30mM. Para cada condição foi preparado um microtubo de PCR com os seguintes componentes: 100ng de RNA, 1µL de Oligo (dT) 50µM, 1µL de 10mM dNTP mix, perfazendo-se um volume final de 10µL com DEPC-treated H<sub>2</sub>O. As reações foram incubadas num termociclador programado para 65°C durante 5min. Após este passo, os microtubos foram colocados no gelo, e uma nova mistura a adicionar à reação anterior composta por: 2µL de 10x RT buffer, 4µL de 25mM MgCl<sub>2</sub>, 2µL de 0,1M DTT, 1µL de RNase Out (40U/µL) e 1µL de SuperScript III RT (200U/µL). Os microtubos foram de novo incubados a 50°C durante 50min. O cDNA foi guardado a -20°C.

#### 3.2.4.3 Análise de expressão dos genes por RT-PCR semi-quantitativo

Para analisar qualitativamente a expressão dos genes de interesse em resposta ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizou-se semi-quantitativo RT-PCR (SQ-RT-PCR). O cDNA obtido para cada uma das condições foi utilizado como molde para as reações de RT-PCR para os três genes de interesse - BXY0122100, BXY0431000, BXY0431400 - e para a actina. O programa da reação de RT-PCR foi o seguinte: 100ng de cDNA, 6,25µL de Mastermix Speedy e 1µL de cada primer *forward* e *reverse*, perfazendo-se um volume final de 12,5µL com DEPC-treated H<sub>2</sub>O. O produto da reação de RT-PCR foi analisado no final dos ciclos nº 15, 19, 23, 27 e 30. Em cada ciclo, pausou-se o termociclador para retirar 5µL de cada reação (condição e gene). Os produtos da reação RT-PCR semi-quantitativo foram analisados e visualizados por eletroforese em gel de agarose 1%.

#### 3.2.5 Hibridação *in situ* dos genes candidatos de *Bursaphelenchus xylophilus*

A hibridação *in situ* é uma técnica, dividida em várias etapas, que utiliza sondas de cDNA para localizar as sequências complementares específicas nos tecidos, tendo por objetivo identificar em que tecidos do nemátode os transcritos são expressos. Através de cortes, as sondas marcadas com DIG entram no corpo do nemátode e hibridam com as sequências complementares, se os genes correspondentes estiverem a ser expressos. Este estudo apenas incluiu os genes BXY0431400 e BXY0431000, pois a localização do transcrito do gene BXY0122100 já foi localizado nas glândulas esofágicas (Espada *et al.*, 2018).

### 3.2.5.1 Síntese da sonda marcada com Digoxigenina (DIG)

A sonda de hibridação para os dois genes testados, BXY0431400 e BXY0431000, foi amplificada a partir do cDNA. Foi amplificado um fragmento entre 200-250pb na região exónica e específica para cada gene. Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 1. O comprimento da sonda é um balanço entre sensibilidade e penetrabilidade. Uma sonda mais curta penetra melhor nos tecidos, mas uma sequência mais longa oferece mais mudanças de detecção. Para isto, preparou-se uma reação de PCR com os seguintes componentes: 100ng de cDNA, 0,5µL de NZYproof Polymerase, 5µL de cada *primer forward* e *reverse* a 10mM, 3µL de 10mM dNTPs e 3µL de 25mM MgCl<sub>2</sub>, perfazendo-se um volume final de 50µL com DEPC-treated H<sub>2</sub>O. O programa de reação de PCR utilizada consistiu em ciclos de temperaturas, iniciando pela desnaturação inicial das cadeias de DNA a 95°C durante 3min, seguindo-se 30 ciclos de amplificação do DNA. Durante os ciclos ocorre a desnaturação do DNA (95°C), hibridação (*annealing*) sendo que a temperatura de *annealing* do gene BXY0431400 é de 53°C e extensão (72°C), cada uma com uma duração de 30s. De seguida, correu-se um gel de agarose para verificar os produtos de PCR. Os fragmentos foram purificados com o Kit QIAquick Gel extraction e quantificados no Qubit™ 4. Para a síntese das sondas de cDNA, incorporou-se a digoxigenina (DIG) em cada gene: BXY0431000 F, BXY0431000 R, BXY04314000 F, BXY04314000 R. Para a síntese de cada sonda *sense* e *anti-sense* foram utilizados individualmente os *primers forward* e *reverse*, respectivamente. As reações de incorporação da DIG ocorreram de acordo com as condições seguintes: 10µL de cDNA, 0,2µL de NZYTaq II 2x green master mix, 4µL de cada 10mM *primer (forward e reverse)*, 1,5µL de 10x DIG DNA, 1,2µL de 25mM MgCl<sub>2</sub> e 2,5µL de 10X Buffer, perfazendo um volume final de 20µL com DEPC-treated H<sub>2</sub>O. O programa de reação de PCR utilizada consistiu em ciclos de temperaturas, iniciando pela desnaturação inicial das cadeias de DNA a 95°C durante 3min, seguindo-se 30 ciclos de amplificação do DNA para o gene BXY0431000 e 35 ciclos de amplificação do DNA para o gene BXY0431400. Durante os ciclos ocorre a desnaturação do DNA (95°C), hibridação (*annealing*) sendo que a temperatura de *annealing* do gene BXY0431400 é de 53°C e extensão (72°C), cada uma com uma duração de 30s. Para verificar a incorporação da DIG nos fragmentos de cada gene foi realizada eletroforese em gel de agarose. As sondas foram guardadas a -20°C.

### 3.2.5.2 Hibridação *in situ*

Os nemátodes utilizados nesta técnica foram extraídos de cultura, centrifugados para obtermos um *pellet* (de cerca de 50µL), num tubo de 15mL. Aos nemátodes vivos (em vários estádios de desenvolvimento) foram adicionados 4mL de paraformaldeído (PFA) a 2% (preparado em laboratório, Anexo 2) para os fixar. Os nemátodes fixados foram guardados durante 2 dias a 4°C. Após esses 2 dias, centrifugou-se durante 2min a 8000rpm e dividiram-se 1mL para vários tubos. Centrifugou-se novamente nas mesmas condições e descartou-se o sobrenadante. De seguida suspendeu-se em 150µL de PFA diluído 10x e pipetou-se 100µL da suspensão para uma lâmina de vidro, tendo os nemátodes sido cortados com ajuda de uma lâmina e movimento vibratório. Lavou-se os pedaços de nemátodes para dentro de um tubo de 1,5mL com PFA diluído 10x. Posteriormente, adicionou-se 1mL de tampão M9, centrifugou-se e descartou-se o sobrenadante, tendo este passo sido feito duas vezes. Adicionou-se 500µL de solução proteinase K (19mg/mL) em M9 ao *pellet* e incubou-se durante 45min à temperatura ambiente num rotador multifunções de microtubos. Centrifugou-se e lavou-se outra vez com 1mL de tampão M9. Voltou-se a centrifugar e descartar o sobrenadante e congelou-se a -20°C durante 15min. Após esse tempo, adicionou-se 1mL de metanol frio e incubou-se durante 30s a -20°C. Centrifugou-se a 13000rpm durante 2min e descartou-se o sobrenadante. De seguida, adicionou-se 1mL de acetona fria e levou-se a incubar 1min a -20°C. Removeu-se o sobrenadante de modo a deixar cerca de 100µL de acetona e reidratou-se com 1mL de água destilada.

A etapa seguinte foi a hibridação das sondas nos tecidos dos nemátodes cortados. Começou-se por centrifugar a 9000rpm durante 2min e descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 500µL de tampão de hibridação para remover a acetona e voltou-se a centrifugar e descartar o sobrenadante. Distribuiu-se 150µL de solução de nemátodes cortados em tampão de hibridação por cada tubo de 0,5mL. Cada tubo de 0,5mL corresponde a uma sonda. Incubou-se durante 15min a 50°C na estufa. Enquanto isto, incubou-se as sondas (sondas cDNA-DIG, *sense* e *anti-sense*) durante 10min a 95°C no termociclador, sendo colocadas imediatamente em gelo. Distribuiu-se as sondas pelos respetivos tubos e incubou-se a 50°C na estufa durante a noite no rotador multifunções de microtubos.

No dia seguinte começou-se por lavar as sondas com o reagente 4xSSC e incubou-se na estufa a 50°C durante 15min no rotador multifunções de microtubos. Este passo repetiu-se 3x, centrifugando-se entre lavagens. Depois lavou-se com o reagente 0,1% SSC e colocou-se na estufa a 50°C durante 20min no rotador multifunções de

microtubos. Novamente, este passo repetiu-se 3x, centrifugando-se entre lavagens. Na etapa seguinte lavaram-se os nemátodes com 100µL de 1x ácido maleico e centrifugou-se imediatamente. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 100µL de 1x reagente *blocking*. Incubou-se no rotador multifunções de microtubos à temperatura ambiente durante 30min. Após esse tempo centrifugou-se e descartou-se o sobrenadante e adicionou-se a mistura de 1mL de 1x reagente *blocking* com 1µL de anticorpo da DIG. Incubou-se no rotador multifunções de microtubos à temperatura ambiente durante 2h. Depois lavou-se com o tampão de lavagem DIG 1x durante 15min no rotador multifunções de microtubos. Repetiu-se este passo 3 vezes, centrifugando-se após a incubação. Posteriormente lavou-se, gentilmente, com tampão de detecção 1x. Centrifugou-se e descartou-se o sobrenadante. De seguida, adicionou-se 100µL de solução stock NBT/BCIP aos tubos e deixou-se a repousar, horizontalmente sem agitação, durante a noite à temperatura ambiente. Manteve-se na horizontal para que houvesse uma penetração igual em toda a amostra.

Após 24 horas, verificou-se a alteração colorimétrica dentro dos tubos (de amarelo para roxo/castanho-escuro). Centrifugou-se os nemátodes e lavou-se com 100µL de 0.01% Tween para parar a reação de coloração, deixando-se cerca de 20µL no tubo. Os nemátodes foram colocados em preparações temporárias de lâminas e lamela para observação ao microscópio ótico e fotografaram-se os resultados com o apoio do software Cell.

### 3.2.6 Equipamentos

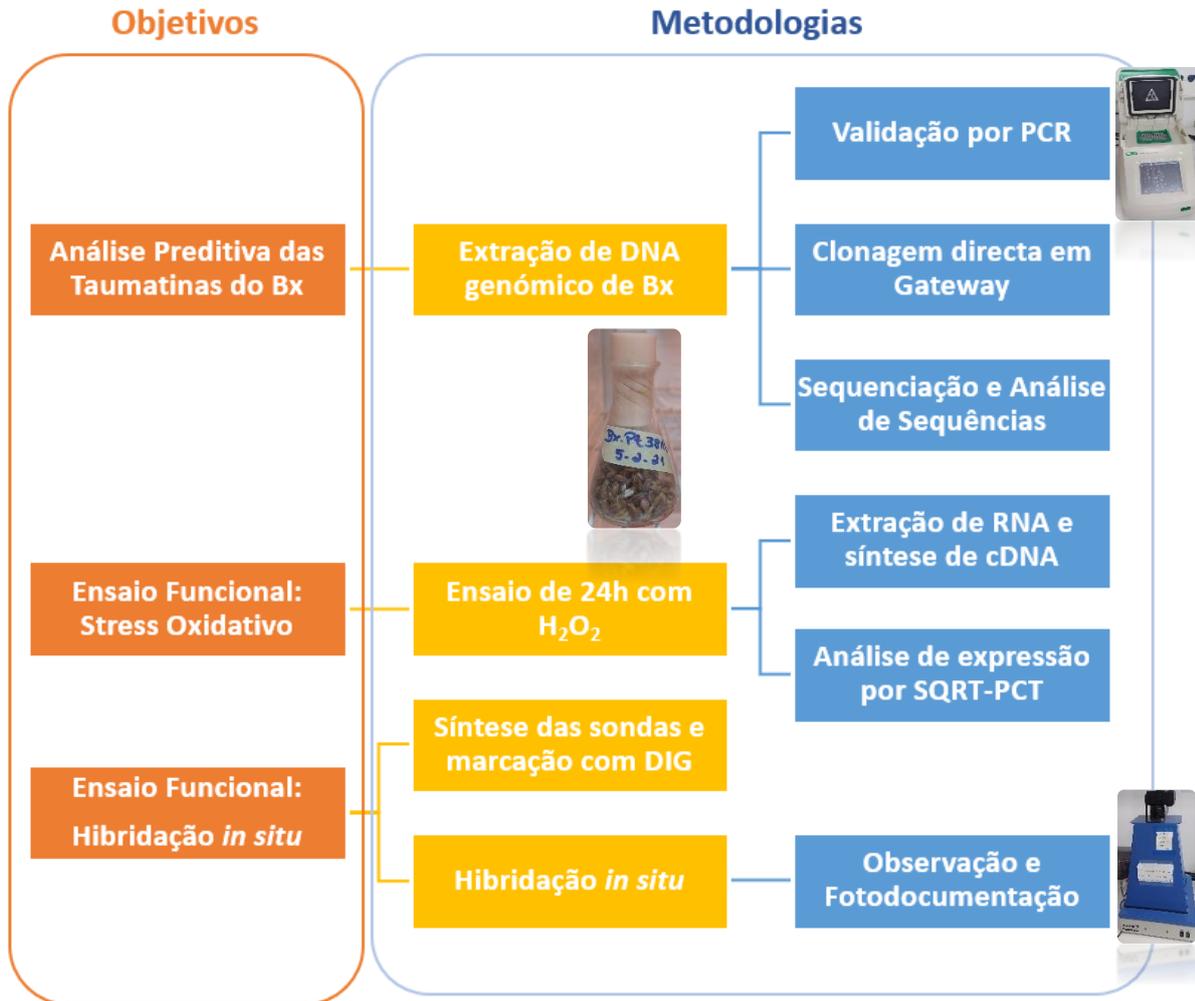
- Centrifuga da marca Scanspeed, modelo Mini
- Congelador, marca beko, modelo RFNE312K31WN V 1850X595
- Estufa com agitação, marca IKA, modelo ks 4000 i control
- Estufa, marca Memmert, modelo estufa universal U
- Fluorómetro da marca Thermo Fisher Scientific, modelo Qubit™ 4 Fluorometer
- Lupa da marca Olympus, modelo SZ61
- Microscópio ótico da marca Olympus, modelo DP70
- Power Source da marca VWR, modelo 300V
- Rotador multifunções de microtubos, marca VWR, modelo Tubo rotator
- Termociclador da marca Biometra, modelo T100 Thermal Cycler
- Termobloco da marca eppendorf, modelo Thermomixer compact
- Transiluminador com sistema de fotodocumentação da marca VWR, modelo GenoView

- Vórtex da marca VWR, modelo 444-1372

### 3.2.7 Reagentes

- Acetona, Roth, Karlsruhe
- 1x Ácido maleico, Roche, Basiléia
- Agarose para electroforese em gel, Lonza, Basel
- Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments, Roche, Basiléia
- dATP, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad
- Green-safe premium, NZYTech, Lisboa
- Kit Purelink Genomic DNA Mini Kit, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad
- Kit QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden
- Kit QIAquick Gel extraction kit, Qiagen, Hilden
- Kit RNeasy mini Kit, Qiagen, Hilden
- Kit SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Invitrogen, Carlsbad
- Kit NZYMiniprep, NZYTech, Lisboa
- Kit pCR8/GW/TOPO, Invitrogen.
- Metanol, Roth, Karlsruhe
- NBT/BCIP Stock solution, Roche, Basiléia
- Paraformaldeído em Tampão M9, preparado em laboratório, Évora
- PFA, Roth, Karlsruhe
- Primers, NZYTech, Lisboa
- Qubit™ dsDNA BR Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad
- 1x Reagente Blocking, Roche, Basiléia
- RNase-Free DNase Set, Qiagen, Hilden
- Tween20, Roth, Karlsruhe
- 0,1x SSC, VWR, Radnor
- 4x SSC, VWR, Radnor
- Solução de proteinase-K, Roche, Basiléia
- Supreme NZYtaq II 2x Green Master Mix, NZYTech, Lisboa
- Tampão de deteção 1x, Roche, Basiléia
- Tampão de hibridação, preparado em laboratório, Évora
- Tampão TBE (Tris Borate EDTA), 10x stock solution, NZYTech, Lisboa

### 3.3 Diagrama de trabalho



## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Análise preditiva de genes candidatos

Com intuito de estudar os genes que codificam proteínas da família das taumatinas presentes no NMP, efetuaram-se análises de similaridade de sequências de aminoácidos através do BlastP e análises do domínio funcional das proteínas através do InterPro (Blum *et al.*, 2020). O BlastP faz parte do BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) que compara similaridade entre sequências biológicas previamente disponibilizadas nas bases de dados públicas e universais de sequências de proteínas. O InterPro é uma base de dados acessível, de alta qualidade e completa de informação de sequências de proteínas e das funções dos seus domínios.

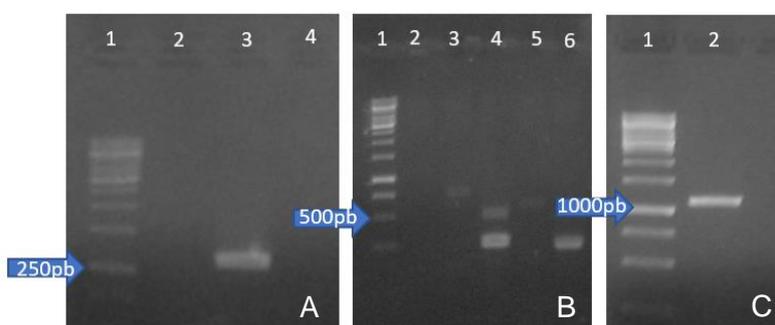
Os resultados das análises preditivas de similaridade de sequências e domínio funcional das proteínas está descrita na Tabela 2. Estas proteínas estão presentes noutros organismos (ortólogos), nomeadamente no *B. okinawaensis* e *C. elegans*, ambos nemátodes de vida livre. Também estão presentes noutras espécies como é o caso da *Crassostrea gigas*, uma espécie marinha nativa do oceano pacífico. Os domínios funcionais destas quatro proteínas são pertencentes à família das taumatinas (IPR037176). Segundo estudos anteriores, esta família mostra ter atividade *in vitro* antifúngica contra diversas espécies de fungos, incluindo fungos fitopatogénicos. No Anexo 3, podemos verificar o resultado das análises InterPro para as quatro sequências em estudo. Duas das proteínas BXY0122100 e BXY0431000 têm com sinal peptídico, ou seja, estão na via secretora (Tabela 2, Anexo 3).

**Tabela 4** - Resultados da análise preditiva realizada para os genes de parasitismo em estudo. A análise de similaridade de sequências e análise do domínio funcional das proteínas foi realizada pelos softwares BlastP e InterPro, respectivamente.

Identificação do gene	Descrição	Accession number	BLASTP		Ortólogos	Domínio funcional	Sinal peptídico
			E-value	Similaridade			
BXY0122100	unnamed protein product [ <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> ]	CAD5148795.1	0.0	100%	<i>B. okinawaensis</i> (73,85%) <i>Crassostrea gigas</i> (46,64%)	IPR037176	Sim
BXY0122000	unnamed protein product [ <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> ]	CAD5148796.1	2e <sup>-64</sup>	100%	<i>B. okinawaensis</i> (89,58%) <i>Caenorhabditis remanei</i> (53,41%)	IPR037176	Não
BXY0431000	unnamed protein product [ <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> ]	CAD5152466.1	2e <sup>-104</sup>	100%	<i>B. okinawaensis</i> (64,68%) <i>Pinus monticola</i> (32%)	IPR037176	Sim
BXY0431400	thaumatin-like protein-2 [ <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> ]	QCI56584.1	5e <sup>-55</sup>	100%	<i>B. okinawaensis</i> (63,51%) <i>Steinernema carpocapsae</i> (60%)	IPR037176	Não

#### 4.2. Validação dos genes que codificam taumatinas

As duas amostras de DNA genómico de *B. xylophilus* extraídas neste estudo apresentaram concentrações de 19,0ng/μL e 35,2ng/μL. Os genes foram apenas amplificados por PCR com os *primers full length* do gene BXY0122100, a partir do gDNA. O tamanho esperado para a região codificante do gene BXY0122100 é de cerca de 894pb, tendo-se verificado uma banda acima dos 1000pb (Figura 6A). O tamanho esperado para a região codificante do gene BXY0431000 é cerca de 390pb. O tamanho do fragmento para hibridação *in situ* é cerca de 180pb. Para o gene BXY0431400, o tamanho esperado para a região codificante é cerca de 381pb e para o fragmento *in situ* é cerca de 198pb. Por fim, o tamanho esperado para a fragmento do gene BXY0122000 *in situ* é cerca de 218pb. Todos estes genes apresentaram bandas acima do esperado (Figura 6B). Isto acontece devido ao facto de termos amplificado os genes a partir de DNA, ou seja, existem exões e intrões nas sequências. Quando se amplifica a partir do cDNA apenas se terá regiões exónicas e assim o ORF é mais pequeno. O produto de PCR foi posteriormente purificado para clonagem (Figura 6C). A expressão dos genes foi analisada por RT-PCR e validou-se a sua expressão no cDNA.

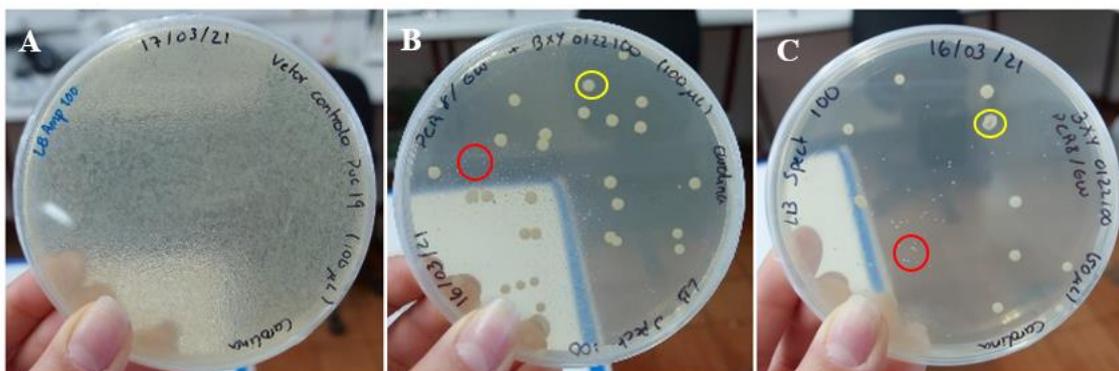


**Figura 6** – Validação dos genes em estudo por PCR e amplificação de sondas para fragmentos de Hibridação *in situ*. Os resultados foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Gel A: Amplificação do gene BXY0122100; Poço 1- Marcador de 1kb; 2- controlo negativo (sem gDNA); 3- amplificação a partir da amostra gDNA [35,2ng/μL]; 4- amplificação a partir da amostra [19,0ng/μL]. Gel B: Poço 1- Marcador de 1kb; 2- amplificação do gene BXY0431000 *full length*; 3- amplificação do fragmento do gene BXY0431000 para hibridação *in situ*; 4- amplificação do fragmento do gene BXY0431400 para hibridação *in situ*; 5- amplificação do gene BXY0431400 *full length*; 6- amplificação do fragmento do gene BXY0122000 para hibridação *in situ*. Gel C: Producto de PCR amplificado do gene BXY0122100 e purificado; Poço 1- marcador de 1kb; Poço 2- produto de PCR purificado.

#### 4.3. Clonagem do gene BXY0122100 em vetor de expressão

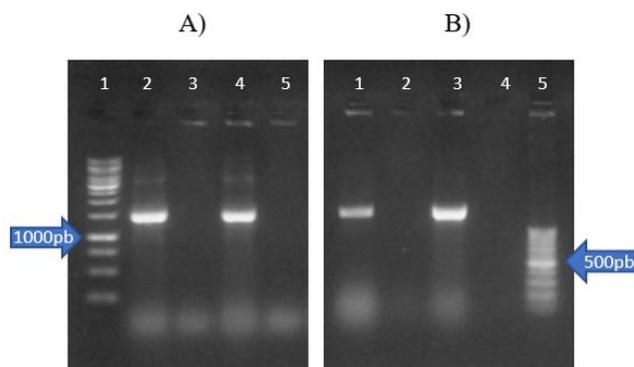
Devido à sua elevada abundância (expressão) nas glândulas esofágicas do *B. xylophilus* (Anexo 2), o gene candidato BXY0122100 foi selecionado para clonagem e posterior sequenciação. Como explicado no procedimento experimental, introduziu-se o

gene de interesse no plasmídeo de clonagem (PCR8/GW) com ajuda da enzima TOPOisomerase. A Figura 7 mostra os resultados da transformação em células competentes da clonagem do gene. A transformação do vetor pUC19 (vetor controle) mostrou uma elevada eficiência na clonagem com um elevado número de colónias. A transformação de PCR8/GW+BXY0122100 mostrou ser eficaz em ambas as concentrações de suspensão bacteriana (50µL e 100µL). Ambas apresentaram dois tipos de colónias, colónias de pequenas dimensões (colónias satélite) e outras de maior tamanho (bactérias com o vetor inserido) (figura 7B e 7C).



**Figura 7** - Clonagem do gene BXY0122100. Resultados da transformação em células competentes Mach1-T1 de: A- 100µL de pUC19 (vetor controle) em LB+Amp; B- 100µL de suspensão bacteriana de pCR8/GW+BXY0122100 em LB+SPE; C- 50µL de suspensão bacteriana de pCR8/GW+BXY0122100 em LB+SPE. Os círculos vermelho e amarelo representam, respetivamente, colónias de pequenas e grandes dimensões que foram selecionadas para o *colony* PCR.

Com o objetivo de confirmar a clonagem do gene BXY0122100, 4 colónias (2 de cada dimensão) foram selecionadas para *colony* PCR (Figura 7B,C; assinaladas a vermelho e amarelo). Os resultados do *colony* PCR estão na Figura 8. Foram confirmados apenas 2 clones positivos de pCR8/GW+BXY0122100 (clone 1 e 3), com um tamanho de banda com aproximadamente 1500pb, inseridos em frame (5'-3') no vetor de clonagem. Com este ensaio é possível perceber que a clonagem do gene foi bem-sucedida, no entanto, os dois clones positivos foram enviados para sequenciação direta. Após a análise do resultado de sequenciação concluímos que, apenas, o clone 1 está corretamente inserido no vetor pCR8/GW (dados não são apresentados). A inserção do gene completo no vetor *gateway* irá permitir a passagem para um vetor de expressão e produção da respetiva proteína recombinante.



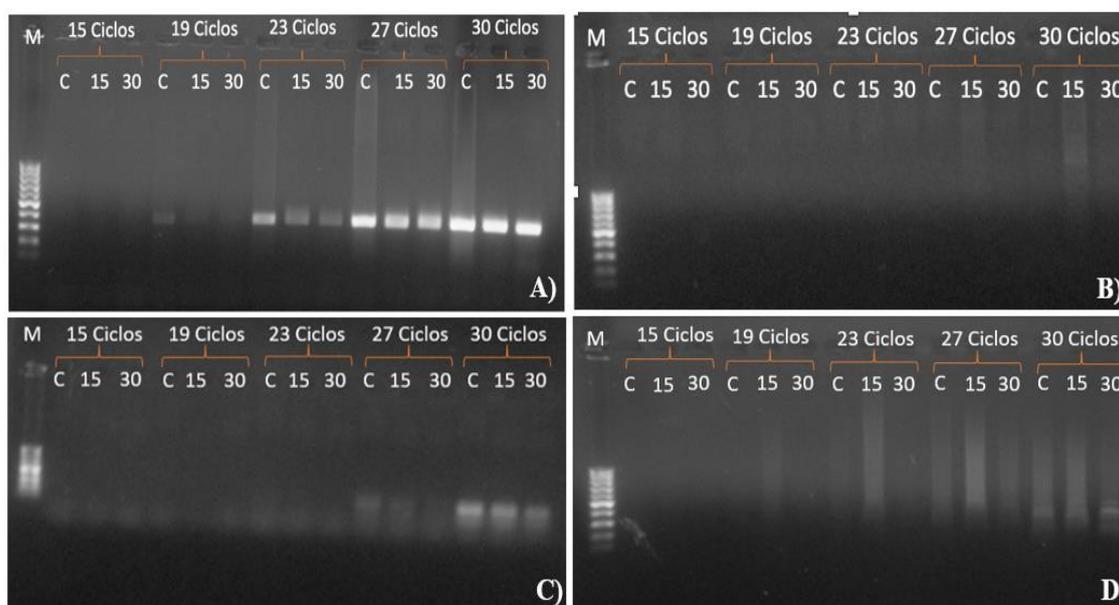
**Figura 8** – Resultados dos colony PCR de pCR8/GW+BXY0122100 analisados por eletroforese em gel de agarose. O Gel A corresponde ao *colony* PCR1, onde amplificamos o vetor com os *primers* universais M13F/M13R. Neste gel: Poço 1- Marcador de 1kb; Poço 2 e 4- clone 1 e 3 correspondentes a colónias grandes; Poço 3 e 5- clone 2 e clone 4 provenientes de colónias satélite. O Gel B corresponde ao colony PCR2, onde amplificamos o vetor com os primers M13F/primer específico do gene R: Poço 1,3: clones 1 e 3; Poço 2 e 4- clones 2 e 4; Poço 5- Marcador de 100pb.

#### 4.4 Ensaio de Stress Oxidativo

O ensaio de stress oxidativo permitiu perceber se as taumatinas em estudo estão ou não envolvidas na resposta ao  $H_2O_2$ . O agente oxidante  $H_2O_2$  é uma das principais espécies reativas (ou ROS) produzidas pelas plantas quando submetidas a um stress biótico/abiótico, estando, portanto, envolvido em importantes funções celulares, como por exemplo molécula sinalizadora. Em estudos anteriores verificou-se que o *B. xylophilus* é altamente resistente ao agente  $H_2O_2$  em diferentes concentrações (Vicente *et al.*, 2015). Neste sentido, colocámos os nemátodes em contacto com o  $H_2O_2$  e compreender se terão a capacidade de sobreviver (nas diferentes concentrações). Para avaliar o efeito do  $H_2O_2$  na expressão dos genes candidatos utilizámos a técnica de SQ-RTPCR.

O SQ-RTPCR permite uma análise qualitativa da expressão dos genes, a partir do cDNA, ou seja, apenas se observa a sua expressão e não a sua quantidade. Os resultados do ensaio mostraram que os nemátodes sobreviveram às duas concentrações de  $H_2O_2$  e também no controlo. É utilizado um gene *housekeeping* (neste estudo, é o gene que codifica a actina) expresso da mesma forma em todos os tecidos, independentemente das condições ou tratamentos. A figura 9A mostra a expressão do gene da actina, nos vários ciclos utilizados neste estudo, onde se pode ver que a actina tem uma expressão visível a partir dos 19<sup>o</sup> ciclos e semelhante em qualquer condição (controlo, 15mM e 30mM  $H_2O_2$ ). Os resultados do SQ-RTPCR para os genes candidatos foram analisados em gel de agarose e mostram que houve expressão dos 3 genes no ensaio.

A figura 9B mostra que a expressão do gene BXY0122100, em comparação com a condição de controlo, é ausente excepto na condição 15mM no 30º ciclo. Este gene poderá estar envolvido na resposta ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, produto de stress oxidativo. A expressão do gene BXY0431000 verificou-se no 27º ciclo, com a diminuição da expressão em abas da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comparativamente ao controlo (Figura 9C). A expressão do gene BXY0431400 observou-se ao 30º ciclo, apresentando um aumento da expressão na condição de 30mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, comparativamente ao controlo (Figura 9D).



**Figura 9** – Resultados do RT-PCR semi-quantitativo (SQ-RT-PCR) analisados por eletroforese em gel de agarose. Aliquotas do produto da reação de SQ-RT-PCR foi retirado ao final dos ciclos 15º, 19º, 23º, 27º e 30º. A- gene da Actina; B- gene BXY0122100; C- gene BXY0431000; D- gene BXY0431400; M- Marcador 100pb; C- Controlo; 15- 15mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 30- 30mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Com base nos resultados obtidos, os genes que codificam as taumatinas parecem estar envolvidas no processo de resposta ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por existir alteração da sua expressão. Pode indicar que as taumatinas poderão estar envolvidas nas respostas ao stress oxidativo por serem capazes de metabolizar estes compostos.

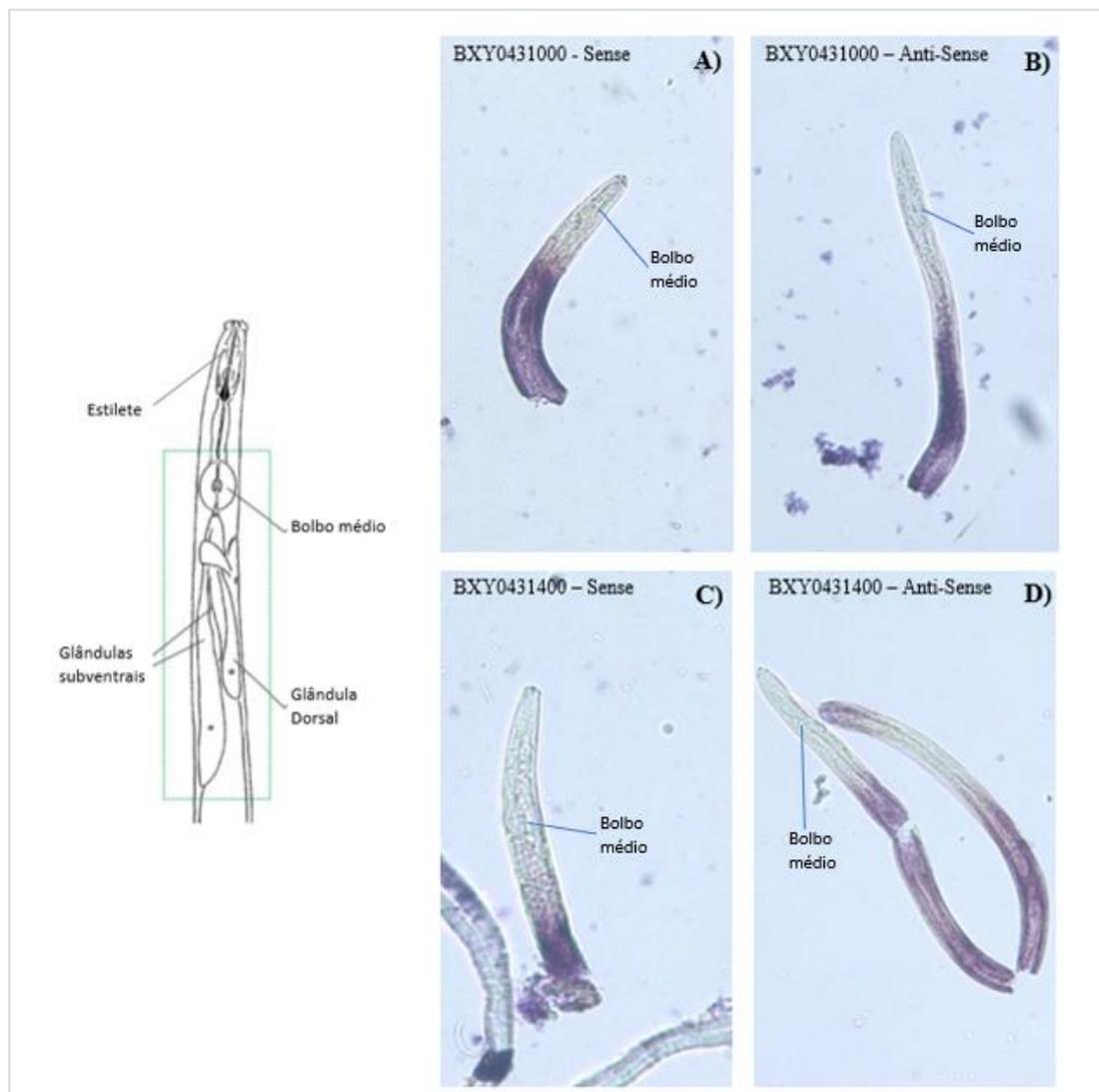
#### **4.5 Hibridação *in situ* dos genes candidatos de *Bursaphelenchus xylophilus***

A hibridação *in situ* é uma técnica que utiliza sondas marcadas com DIG, amplificadas a partir de cDNA, para localizar em que tecidos do NMP os transcritos estão a ser expressos. Neste caso, o objectivo de utilizar esta técnica é compreender se as proteínas candidatas estão a ser expressas nas glândulas esofágicas ou noutros tecidos. Nos nemátodes fitoparasitas a maioria das proteínas de parasitismo são expressas nas glândulas esofágicas e, as que têm sinal peptídico, são secretadas no

hospedeiro através do estilete (Figura 4, 5). A técnica foi realizada apenas com os genes BXY04310000 e BXY0431400. O gene BXY0122100 não entrou neste ensaio, pois já foi validada a sua presença nas glândulas esofágicas (Espada *et al.*, 2018).

Os resultados da hibridação *in situ* para as sondas *sense* e *anti-sense* dos genes BXY04310000 e BXY0431400 estão representados na Figura 10. Podemos verificar para ambos os genes que a técnica *in situ* funcionou, pois a sonda hibridou nos tecidos. A sonda *sense* (sintetizada com o *primer forward*) funciona apenas como controlo e a sonda *anti-sense* (*primer reverse*) é a sonda específica onde deve de ocorrer a hibridação. Os resultados para o gene BXY0431000 mostram que não existe uma resposta diferenciada na sonda específica nem na sonda de controlo (Figura 10A,B), no entanto há sinal de hibridação dado pela cor roxa. Não existe nenhum tecido específico em que o transcrito esteja a ser expresso. No gene BXY0431400 (Figura 10C,D) as duas sondas mostraram sinal mas parece que não hibridaram em nenhuma zona específica, no entanto, alguns nemátodes parecem ter sinal no intestino (Figura 10D). Como se obtiveram poucos pedaços de nemátodes para estas sondas, não se pode tirar esta conclusão e, por conseguinte, seria necessário voltar a repetir a técnica.

Os genes que codificam domínio das taumatinas são secretadas/expressas no intestino (BXY0431400) e nas glândulas esofágicas (BXY0122100), que poderá indicar diferentes funções como a digestão de substâncias tóxicas da planta, ou a secreção destas diretamente nas células do hospedeiro, respetivamente. Neste sentido, estes genes que codificam as taumatinas poderão estar envolvidos na metabolização de compostos de stress oxidativo (como o peróxido de hidrogénio) e poderão ter uma ação de defesa do NMP em interação com o hospedeiro.



**Figura 10** – Resultados de hibridação *in situ* dos genes BXY0431000 e BXY0431400. As imagens foram obtidas por microscopia óptica (ampliação 20x). Para cada gene utilizaram-se duas sondas: *sense* é a sonda de controlo (*primer forward*) e *anti-sense* é a sonda específica (*primer reverse*). Na ilustração à esquerda é possível ver identificadas as estruturas na região anterior do NMP.

## 5. Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir:

- Os três genes candidatos e validados neste estudo (BXY0122100, BXY0431000 e BXY0431400) foram identificados como sendo pertencentes à família das taumatinas.
- O gene BXY0122100 foi corretamente clonado num vetor *gateway* o que poderá potenciar futuras aplicações com a inserção em vetores de expressão, para a produção da proteína recombinante.
- A hibridação *in situ* mostrou que o gene BXY0431400 está, provavelmente, localizado no intestino. Diferentes genes que codificam as taumatinas têm diferentes localizações nos tecidos do NMP.
- O NMP é capaz de sobreviver em diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio.
- As taumatinas do NMP parecem estar envolvidas na resposta ao peróxido de hidrogénio, sendo o gene BXY0431000 que apresentou um maior aumento da sua expressão.
- Possivelmente as diferentes taumatinas podem estar envolvidos na defesa do NMP em interação com o hospedeiro.

## 6. Referências

- Ali, N., Tavoillot, J., Martiny, B., Fossati-Gaschignard, O., Plas, S., Dmowska, E., Winiszewska, G., Chapuis, E., Rulliat, E., Jimenez, D., Granereau, G., Barbier, S., Héraud, C., Gautheron, N., Edel-Hermann, V., Steinberg, C., & Mateille, T. (2021). Legacy of plant-parasitic nematode communities from past ecosystems and shift by recent afforestation. *Global Ecology and Conservation*, 26. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e01423>
- Alves, M., Pereira, A., Vicente, C., Matos, P., Henriques, J., Lopes, H., Nascimento, F., Mota, M., Correia, A., & Henriques, I. (2018). The role of bacteria in Pine Wilt Disease: Insights from microbiome analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(7), 1–13. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy077>
- BALDO, A., NORELLI, J.L., FARRELL Jr. R., BASSET, C.L., ALDWINCKLE, H.S., MALNOY, M., 2010. Identification of genes differentially expressed during interaction of resistant and susceptible apple cultivars (*Malus x domestica*) with *Erwinia amylovora*. *BMC Plant Biology* 10(1). doi:10.1186/1471-2229-10-1
- Blaxter, M., & Koutsovoulos, G. (2015). The evolution of parasitism in Nematoda. *Parasitology*, 142, S26–S39. <https://doi.org/10.1017/S0031182014000791>
- Blum M, Chang H, Chuguransky S, Grego T, Kandasamy S, Mitchell A, Nuka G, Paysan-Lafosse T, Qureshi M, Raj S, Richardson L, Salazar GA, Williams L, Bork P, Bridge A, Gough J, Haft DH, Letunic I, Marchler-Bauer A, Mi H, Natale DA, Necci M, Orengo CA, Pandurangan AP, Rivoire C, Sigrist CJA, Sillitoe I, Thanki N, Thomas PD, Tosatto SCE, Wu CH, Bateman A and Finn RD The InterPro protein families and domains database: 20 years on. *Nucleic Acids Research*, Nov 2020, (doi: 10.1093/nar/gkaa977)
- Butcher, R. A. (2019). Natural products as chemical tools to dissect complex biology in *C. elegans*. *Current Opinion in Chemical Biology*, 50, 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.03.005>
- Cardoso, C., & Quelhas, V. (2014). Portugal Global. *Portugal Global*, 12–23.
- Corsi, A. K., Wightman, B., & Chalfie, M. (2015). A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 200(2), 387–407. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.176099>
- Davis EL, Hussey RS, Baum TJ (2004). Getting to the roots of parasitism by nematodes. *Trends in Parasitology* 20(3): 134-141.
- Em, M., Alta, B. D. E., & Dose, T. D. E. (2010). Universidade de Lisboa faculdade de

ciências. *Disertation 75p.*

- Ekino, T., Kirino, H., Kanzaki, N. et al. Ultrastructural plasticity in the plant-parasitic nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Sci Rep* 10, 11576 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68503-3>
- Espada, M. (2018). *Functional characterization of putative effectors in pinewood nematode, Bursaphelenchus xylophilus*. Tese de Doutorado em Biologia, Universidade de Évora 136p.
- Espada, M., den Akker, S. E. van, Maier, T., Vijayapalani, P., Baum, T., Mota, M., & Jones, J. T. (2018). STATAWAARS: A promoter motif associated with spatial expression in the major effector-producing tissues of the plantparasitic nematode *Bursaphelenchus xylophilus* [BMC Genomics., 19, (2018) (553)] DOI: 10.1186/s12864-018-4908-2. *BMC Genomics*, 19(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4990-5>
- Espada, M., Silva, A. C., Eves Van Den Akker, S., Cock, P. J. A., Mota, M., & Jones, J. T. (2016a). Identification and characterization of parasitism genes from the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* reveals a multilayered detoxification strategy. *Molecular Plant Pathology*, 17(2), 286–295. <https://doi.org/10.1111/mpp.12280>
- Espada, M., Jones, J. T., & Mota, M. (2016b). Characterization of glutathione S-transferases from the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Nematology*, 18(6), 697–709. <https://doi.org/10.1163/15685411-00002985>
- Faria, J. M. S., Sena, I., Vieira da Silva, I., Ribeiro, B., Barbosa, P., Ascensão, L., Bennett, R. N., Mota, M., & Figueiredo, A. C. (2015). In vitro co-cultures of *Pinus pinaster* with *Bursaphelenchus xylophilus*: a biotechnological approach to study pine wilt disease. *Planta*, 241(6), 1325–1336. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2257-9>
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Kim, BN., Kim, J.H., Ahn, JY. et al. A short review of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Toxicol. Environ. Health Sci.* 12, 297–304 (2020). <https://doi.org/10.1007/s13530-020-00068-0>
- Leisico, FMP, Descoberta de marcadores de patogenicidade em *B. xylophylus*. (2013) Tese de Doutorado em Biotecnologia, Universidade de Aveiro, 186p.
- Futai, K. (2013) Pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Annu Rev*

*Phytopathol.* 51, 5.1-5.23.

- Haegeman, A., Mantelin, S., Jones, J. T., & Gheysen, G. (2012). Functional roles of effectors of plant-parasitic nematodes. *Gene*, 492(1), 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.10.040>
- Hu, L. J., Wu, X. Q., Li, H. Y., Wang, Y. C., Huang, X., Wang, Y., & Li, Y. (2020). BxCDP1 from the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* is recognized as a novel molecular pattern. *Molecular Plant Pathology*, 21(7), 923–935. <https://doi.org/10.1111/mpp.12939>
- Inácio, M. L., Nóbrega, F., Vieira, P., Bonifácio, L., Naves, P., Sousa, E., & Mota, M. (2015). First detection of *Bursaphelenchus xylophilus* associated with *Pinus nigra* in Portugal and in Europe. *Forest Pathology*, 45(3), 235–238. <https://doi.org/10.1111/efp.12162>
- Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G. J., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G. K., Kikuchi, T., Manzanilla-López, R., Palomares-Rius, J. E., Wesemael, W. M. L., & Perry, R. N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 14(9), 946–961. <https://doi.org/10.1111/mpp.12057>
- Jones, J. T., Moens, M., Mota, M., Li, H., & Kikuchi, T. (2008). *Bursaphelenchus xylophilus*: Opportunities in comparative genomics and molecular host-parasite interactions. *Molecular Plant Pathology*, 9(3), 357–368. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00461.x>
- Kikuchi, T., Cotton, J. A., Dalzell, J. J., Hasegawa, K., Kanzaki, N., McVeigh, P., Takanashi, T., Tsai, I. J., Assefa, S. A., Cock, P. J. A., Da Otto, T., Hunt, M., Reid, A. J., Sanchez-Flores, A., Tsuchihara, K., Yokoi, T., Larsson, M. C., Miwa, J., Maule, A. G., ... Berriman, M. (2011). Genomic insights into the origin of parasitism in the emerging plant pathogen *bursaphelenchus xylophilus*. *PLoS Pathogens*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002219>
- Kirino, H., Yoshimoto, K., & Shinya, R. (2020). Thaumatin-like proteins and a cysteine protease inhibitor secreted by the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* induce cell death in *Nicotiana benthamiana*. *PLoS ONE*, 15(10 October), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241613>
- Lisboa, A.F.D.L. (2016). Melhoramento genético florestal e o desafio imposto pela doença da murchidão do pinheiro. Lisboa: ISA, 45 p.
- Li Z, Zhang Q, Zhou X. A 2-Cys peroxiredoxin in response to oxidative stress in the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Sci Rep.* (2016) Jun 7;6:27438. doi: 10.1038/srep27438. PMID: 27271000; PMCID: PMC4895224.

- Ma, Y., Qu, Z. L., Liu, B., Tan, J. J., Asiegbu, F. O., & Sun, H. (2020). Bacterial community structure of *Pinus thunbergii* naturally infected by the nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Microorganisms*, 16p. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020307>
- Marques, W. A. (2019). *Importação e exportação de produtos da madeira, cortiça e suas obras*. 45–56.
- Moens, M. and Perry, R. (2009) Migratory plant endoparasitic nematodes: a group rich in contrasts and divergence. *Ann. Rev. Phytopathol.* 47, 313-32.
- Mota, M. M., & Vieira, P. (2008). Pine wilt disease: A worldwide threat to forest ecosystems. *Pine Wilt Disease: A Worldwide Threat to Forest Ecosystems*, 1, 1–405. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8455-3>
- Mota, M. M., Braasch, H., Bravo, M. A., Penas, A. C., Burgermeister, W., Metge, K., & Sousa, E. (1999). First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology*, 1(7–8), 727–734. <https://doi.org/10.1163/156854199508757>
- Naves, P., Bonifácio, L., Inácio, M. L., & Sousa, E. (2018). Integrated management of pine wilt disease in Troia. *Revista de Ciências Agrárias*, 41(SPE), 11–20. <https://doi.org/10.19084/RCA.17060>
- Nunes da Silva, M., Pintado, M. E., Sarmiento, B., Stamford, N. P., & Vasconcelos, M. W. (2019). A biofertilizer with diazotrophic bacteria and a filamentous fungus increases *Pinus pinaster* tolerance to the pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Biological Control*, 132(October 2016), 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.01.013>
- OEPP/EPPO (2018). PM 9/1 (6) *Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors: procedures for official control Bulletin 48 (3): 503–515. <https://doi.org/10.1111/epp.12505>
- Penas, A. C., Bravo, M. A., Naves, P., Bonifácio, L., Sousa, E., & Mota, M. (2006). Species of *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Nematoda: Parasitaphelenchidae) and other nematode genera associated with insects from *Pinus pinaster* in Portugal. *Annals of Applied Biology*, 148(2), 121–131. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2006.00042.x>
- Perry, R. and Moens, M. (2011) Introduction to plant-parasitic nematodes; modes of parasitism. In *Genomics and molecular of plant-nematode interactions* (Jones, J.T., Gheysen, G., Fenoll, C., eds), 3-20. Springer Science+Business Media.
- Rajasekharan, S. K., Raorane, C. J., & Lee, J. (2020). Nematicidal effects of piperine on the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 23(4), 863–868. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2020.07.022>
- Santos, C. and Vasconcelos, M. (2011). Resposta Fisiológica de *Pinus* spp. nas

Primeiras Horas após Infecção com *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae). *Silva Lusitana*, 19(1), 99–110.

Silva, AC, Identification of novel effectors from the pinewood nematode “*Bursaphelenchus xylophilus*”. Tese de Mestrado Europeu, EUMAINE. Ghent, Bélgica, Setembro 2014, 48p.

Sousa, E., Vale, F., Abrantes, I., - Pine wilt disease in Europe: biological interactions and integrated management. 2º ed. Lisboa: FNAPF, 2015. 328 p. ISBN 978 - 989 - 99365 - 2 - 2

Tsai, I. J., Tanaka, R., Kanzaki, N., Akiba, M., Yokoi, T., Espada, M., Jones, J. T., & Kikuchi, T. (2016). Transcriptional and morphological changes in the transition from mycetophagous to phytophagous phase in the plant-parasitic nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Molecular Plant Pathology*, 17(1), 77–83. <https://doi.org/10.1111/mpp.12261>

Vicente, C., Inácio, M. (2021). Estudo das interações nemátode-fungo na doença da murchidão do pinheiro - PineEnemy | Mycoexplorer, 1p.

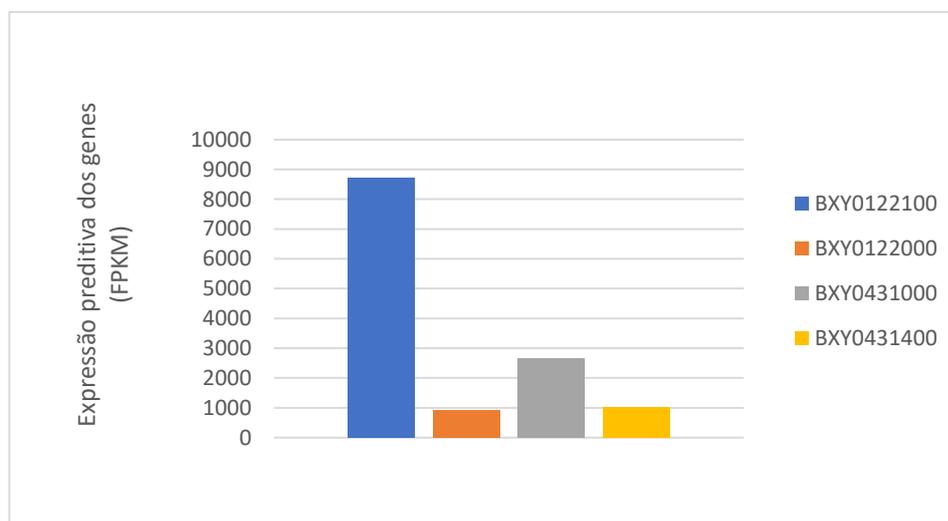
Vicente, C. S. L., Ikuyo, Y., Shinya, R., Mota, M., Hasegawa K. (2015) Catalases induction in high virulence pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* under hydrogen peroxide-induced stress. *PLoS ONE*10(4): e0123839, 13p.

Vicente, C., Espada, M., Vieira, P., & Mota, M. (2012). Pine Wilt Disease: A threat to European forestry. *European Journal of Plant Pathology*, 133(1), 89–99. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9924-x>

Caracterização molecular de genes de parasitismo do nemátode da madeira do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*, em interação com o hospedeiro

## **ANEXOS**

## ANEXO 1 – Expressão preditiva dos genes taumatinas de *Bursaphelenchus xylophilus* nas glândulas esofageais



Expressão preditiva (FPKM) dos genes que codificam as taumatinas de *B. xylophilus* nas glândulas esofágicas. Dados obtidos através da sequenciação do RNA das glândulas esofágicas (adaptado de Espada *et al.*, 2018).

## ANEXO 2 – Preparação de Soluções para Hibridação *in situ*

### Preparação de tampão de hibridação

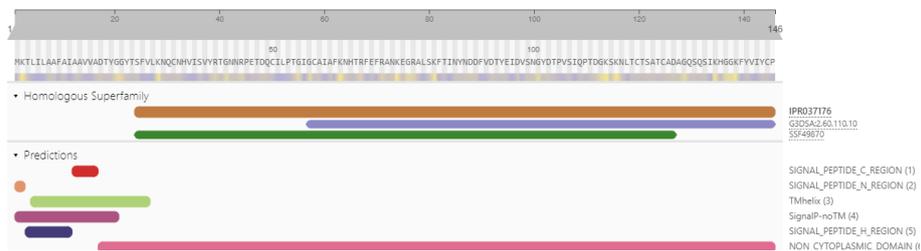
Adicionar 5mL de formamida desionizada a 2mL 20x SSC, 1mL de reagente de blocking a 10%, 1mL de 20% SDS, 100µL de 100x Denhardt's, 20µL de 0,5M EDTA (pH 8.0), 200µL de Fish sperm DNA (10mg/mL), 62,5µL de yeast tRNA (500U/mL) e 617,5µL de DEPC-H<sub>2</sub>O. Homogeneizar e aliquotar em tubos de 1,5mL. Guardar a -20°C.

### Preparação de paraformaldeído a 2% em tampão M9

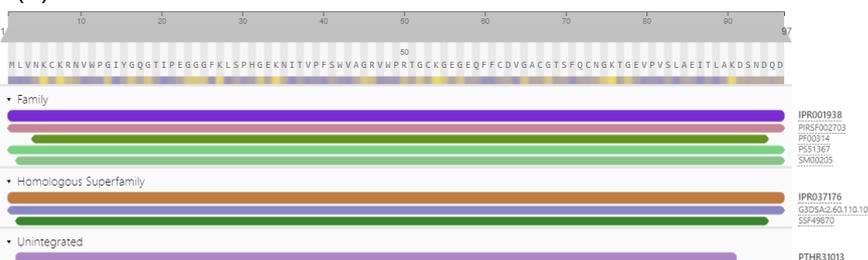
Adicionar 0,4 g de paraformaldeído a 20 ml de tampão M9 e aquecer num gobelé (sem fervura) para dissolver o paraformaldeído. Cobrir o copo com papel alumínio durante o aquecimento. Adicionar algumas gotas de hidróxido de sódio e leve o pH para 7,4 para ajudar a dissolver. Deixe arrefecer até a temperatura ambiente e ajuste o volume para 20 ml com tampão M9. Aliquotar 5mL em tubos de centrifugação de 15mL. Guardar a -20°C.

## ANEXO 3 – Análise preditiva dos domínios funcionais das proteínas em estudo

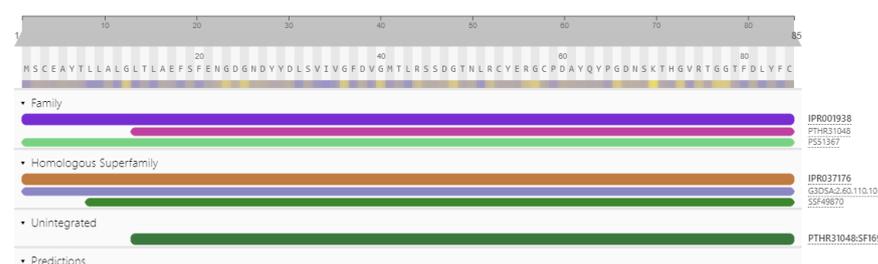
(a)



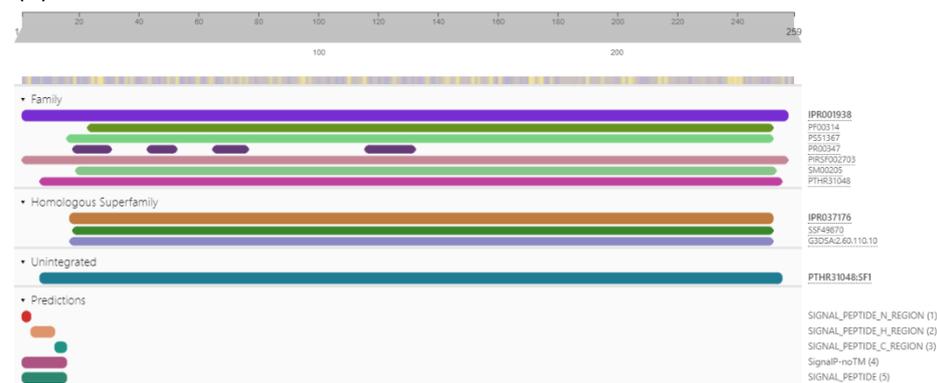
(b)



(c)



(d)



Análises preditivas dos domínios funcionais das proteínas em estudo utilizando o *software* e base de dados pública InterPro. As imagens obtidas representam análises preditivas para (a) BXY0122100; (b) BXY0122000; (c) BXY0431000; (d) BXY0431400.