



PARASITISMO NO NEMÁTODE DA MADEIRA DO PINHEIRO

ESTUDO DOS MECANISMOS DE REGULAÇÃO DE GENES PARA O CONTROLO DA DOENÇA



FIGURA 1. O nemátode da madeira do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*, organismo de quarentena (OEPP, organismo quarentena lista A2) causador da doença da murchidão do pinheiro (ampliação 200x).

Margarida Espada¹
 Madalena Mendonça¹, Manuel Mota¹
 Maria de Lurdes Inácio²

¹ MED – Instituto Mediterrâneo para a Agricultura, Ambiente e Desenvolvimento, Instituto de Investigação e Formação Avançada, Universidade de Évora

² INIAV, I.P. – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

INTRODUÇÃO

A Fileira do Pinho representou, em 2020, 80% dos postos de trabalho e 45% do volume de negócios nas indústrias florestais, assim como mais de 3% das exportações nacionais de bens. Há, no entanto, um défice de 2,3Mm³ de madeira de pinho que é justificado pelo fogo e a presença do nemátode da madeira do pinheiro

(NMP), *Bursaphelenchus xylophilus* (Centro PINUS, 2021) (**Figura 1**). A doença da murchidão do pinheiro, causada pelo NMP, é considerada uma ameaça para as florestas de pinheiros em todo o mundo e a sua rápida disseminação nos países aonde foi detetada tem causado um grande impacto ao nível da sustentabilidade dos sistemas agroflorestais e de perda de biodiversidade. Uma vez que a mortalidade do pinheiro-bravo causada pelo NMP e a rápida propagação da doença podem ser exponenciadas pela combinação de condições climáticas, como a seca e as temperaturas mais elevadas, prevê-se que a frequência e propagação da doença será cada vez maior, nos pinhais aonde já existe, e ameaça aqueles ainda não afetados existentes na região mediterrânica.

NEMÁTODE DA MADEIRA DO PINHEIRO (NMP)

Em linha com as estratégias da União Europeia, do Pacto Ecológico Europeu e Objetivos de Desenvolvimento Sustentáveis das Nações Unidas, é urgente encontrar soluções sustentáveis para controlo desta doença, realçando a sua complexidade e modo de propagação. O uso restrito de pesticidas e outras moléculas requer novas medidas de controlo mais integrativas.

«Uma vez que a mortalidade do pinheiro-bravo causada pelo NMP e a rápida propagação da doença podem ser exponenciadas pela combinação de condições climáticas, como a seca e as temperaturas mais elevadas, prevê-se que a frequência e propagação da doença será cada vez maior (...).»

Contudo, o desafio persiste: para encontrar novas soluções sustentáveis é crucial compreender os mecanismos através dos quais os organismos parasitam as plantas. A interação dos nemátodes fitoparasitas (NFP), e do NMP em particular, com os seus hospedeiros é mediada por proteínas de parasitismo: proteínas produzidas pelo parasita e secretadas dentro das células do hospedeiro vegetal que irão promover a doença. Este nemátode possui duas fases diferentes no seu ciclo de vida, uma fase parasítica com alimentação fitófaga e outra fase em que é micetófago, ou seja, em que sobrevive à custa dos fungos existentes na árvore afetada. Esta característica distingue o NMP de outros nemátodes fitoparasitas, e permite que este se reproduza e sobreviva quando a árvore hospedeira entra em declínio e a comunidade de fungos é abundante (Espada *et al.*, 2016; Vicente *et al.*, 2022). Na sua interação com o hospedeiro, o nemátode produz várias enzimas, com diferentes funções, que lhe permitem degradar a parede celular, migrar e ali-



mentar-se nos tecidos do hospedeiro (Jones *et al.*, 2008; Espada *et al.*, 2018). A maioria destas enzimas é produzida nos tecidos especializados no parasitismo – as glândulas esofágicas (Figura 2).

PROJETO NEMAWAARS

O melhoramento das plantas e resistência à doença causada pelos NFP pode ser conseguida através da identificação das proteínas de parasitismo e da sua posterior modificação de forma a bloquear a sua função no hospedeiro. Como é que o parasitismo é regulado e que mecanismos controlam a expressão dos genes de parasitismo? E se por compreendermos a interação molecular, pudermos desligar a expressão dos genes, de maneira a diminuir o sucesso do fitoparasita? O projeto NemaWAARS – “O *motif* para desvendar os mecanismos de regulação de genes de parasitismo no nemátode da madeira do pinheiro para o controlo da doença e desenvolvimento de plantas resistentes” (PTDC/ASP-PLA/1108/2021), financiado por fundos nacionais através do orçamento da Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I. P., (FCT/MCTES), pretende identificar os elementos reguladores de expressão de genes de parasitismo do NMP e compreender o impacto da sua disrupção e de que forma afetará a função dos vários genes no sucesso da infeção do NMP.

«Este poderá ser um novo e atrativo foco para silenciamento em plantas: se bloquear a expressão do regulador, a expressão de outros genes de parasitismo será interrompida e irá inibir a capacidade de infeção do NMP»

Esta ideia surge após a descoberta de uma característica genética associada aos genes de parasitismo do NMP, descrita em Espada *et al.* (2018). A hipótese colocada é a de que se interrompermos o(s) regulador(es), poderemos desligar simultaneamente a expressão de vários genes. Este poderá ser um novo e atrativo foco para silenciamento em plantas: se bloquear a expressão do regulador, a expressão de outros genes de parasitismo será interrompida e irá inibir a capacidade de infeção do NMP. A estratégia

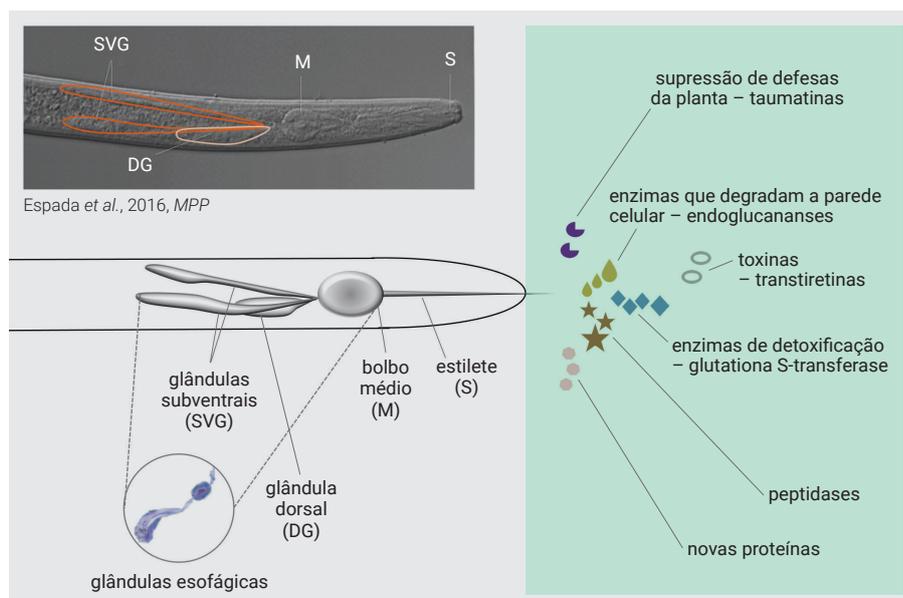


FIGURA 2. Esquema representativo da interação entre o nemátode fitoparasita *Bursaphelenchus xylophilus* e as células da planta hospedeira (*Pinus* sp.), mediada por proteínas relacionadas com o parasitismo e (maioritariamente) expressas nas glândulas esofágicas (SVG e DG), que estão localizadas na região anterior do nemátode. Estas proteínas são secretadas para o interior das células do hospedeiro através do estilete (S). Diferentes proteínas envolvidas no parasitismo estão envolvidas na migração, alimentação e defesas do nemátode fitoparasita; outras proteínas que não se sabe qual a sua função (“novas proteínas”) e não têm similaridade com proteínas disponíveis nas bases de dados públicas.

de NemaWAARS irá incluir abordagens inovadoras, aplicadas no estudo do NMP. O trabalho irá incluir a localização espacial e temporal dos genes de parasitismo, silenciamento por RNA de interferência dos fatores de transcrição, análise de transcriptômica e proteômica e testes *in vitro* de validação funcional com o hospedeiro. É esperado obter novos resultados nas moléculas que se ligam aos promotores e que, uma vez bloqueados, poderão mostrar uma nova área a explorar na regulação do parasitismo no NMP.

O projeto NemaWAARS iniciou-se em janeiro de 2022 e reúne uma equipa de investigação nacional multidisciplinar pertencente ao MED – Instituto Mediterrâneo para a Agricultura, Ambiente e Desenvolvimento, Universidade de Évora e INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária/Oeiras, e colaboradores internacionais, na USDA – *United States Department of Agriculture/Washington* e na Universidade de Cambridge, no Reino Unido. NemaWAARS irá contribuir com novas estratégias e dados que poderão ser atrativos para a Fileira do Pinho, capazes de desenvolver novas (e alternativas) estratégias de controlo da doença da murchidão do pinheiro. 🍋



BIBLIOGRAFIA

- Centro PINUS (2021). A Fileira do pinho em 2020 - Indicadores da fileira do pinho. Outubro 2021 (6ª edição digital anual “Indicadores da Fileira do Pinho”).
- Espada M., Silva A.C., Eves-van den Akker S., Cock P.J.A., Mota M., Jones J.T. (2016). Identification and characterization of parasitism genes from the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* reveals a multi-layered detoxification strategy. *Mol Plant Pathol*, 17, 286–95.
- Espada M., Eves-van den Akker S., Maier T., Paramasivan V., Baum T., Mota M., and 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, 553: 1–13.
- Jones, John T. et al. 2008. “*Bursaphelenchus xylophilus*: Opportunities in Comparative Genomics and Molecular Host-Parasite Interactions.” *Molecular Plant Pathology* 9(3): 357–68.
- Vicente C.S.L., Soares M., Faria J.M.S., Espada M., Mota M., Nóbrega F., Ramos A.P. and Inácio M.L. (2022). Fungal Communities of the Pine Wilt Disease Complex: Studying the Interaction of Ophiostomatales with *Bursaphelenchus xylophilus*. *Front. Plant Sci.* 13:908308. doi: 10.3389/fpls.2022.908308