



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

**Departamento de Química e Bioquímica**

**Avaliação da expressão relativa de enzimas antioxidantes do  
nemátode fitoparasita *Pratylenchus penetrans* envolvidas na  
resposta ao composto orgânico 3-Octanol**

**Relatório de estágio realizado por José De Bruijn**

**Orientador:** Cláudia S. L. Vicente Letras

**Co-orientador:** Margarida Espada

**Évora**

**2023**



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

**Departamento de Química e Bioquímica**

**Avaliação da expressão relativa de enzimas antioxidantes do  
nemátode fitoparasita *Pratylenchus penetrans* envolvidas na  
resposta ao composto orgânico 3-Octanol**

**Relatório de estágio realizado por José De Bruijn**

**Orientador:** Cláudia S. L. Vicente Letras

**Co-orientador:** Margarida Espada

**Évora**

**2023**

“Este trabalho não inclui as observações do júri”

## **Agradecimentos**

Estou grato pela oportunidade de poder trabalhar no laboratório de Nematologia (NemaLab) onde experienciei um forte apoio na minha aprendizagem por parte das orientadoras, Doutora Cláudia Vicente, Doutora Margarida Espada, e Dra. Marina Costa, e onde fui recebido com carinho pela equipa do laboratório. De facto, foi das experiências mais enriquecedoras que tive na minha instrução e formação. Agradeço por toda a disponibilidade e dedicação que senti ao longo do estágio.

Sei também que esta experiência não seria possível, não fosse a Universidade de Évora que é a instituição na qual este projeto se desenvolve, onde cresci e aprendi durante o decurso da licenciatura, desenvolvi os conhecimentos que serão sempre de grande valor e onde conheci pessoas extraordinárias. Agradeço por isso aos docentes que me facultaram esta experiência.

A conclusão desta etapa é uma razão para celebrar com amigos e família, as pessoas que sempre estiveram comigo a quem devo a maior consideração, pelo que é impossível não me lembrar do meu avô Miguel Raposo que infelizmente já não está connosco.

# Índice

<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>I</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>IV</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>V</b>
<b>LISTA DE GRÁFICOS .....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>IX</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
1.1 O IMPACTO DOS NEMÁTODES FITOPARASITAS NA AGRICULTURA .....	10
1.1.1 <i>O nemátode das lesões radiculares, Pratylenchus spp.</i> .....	10
1.1.2 <i>Controlo dos nemátodes das lesões radiculares</i> .....	12
1.2 O PAPEL DO STRESS OXIDATIVO NOS MECANISMOS DE DEFESA CONTRA OS NEMÁTODES FITOPARASITAS .....	13
1.2.1 <i>Mecanismos de defesa das plantas.</i> .....	13
1.2.2 <i>Stress oxidativo</i> .....	16
<b>2. PROBLEMA E OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
2.1 PROBLEMA.....	19
2.2 OBJETIVOS GERAIS .....	19
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>21</b>
3.1 ESTRATÉGIA.....	21
3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	22
3.2.1 <i>Análise in silico dos genes que codificam enzimas antioxidantes de Pratylenchus penetrans.</i> 22	
3.2.2 <i>Validação dos genes que codificam enzimas antioxidantes de Pratylenchus penetrans</i> .....	22
3.2.2.1 <i>Extração do DNA total</i> .....	22
3.2.2.2 <i>Amplificação dos genes de interesse por PCR</i> .....	23
3.2.2.3 <i>Electroforese em gel de agarose</i> .....	24
3.2.2.4 <i>Purificação dos produtos de PCR, sequenciação e análise de sequências</i> .....	24
3.2.3 <i>Estudo do efeito do composto 3-octanol na expressão relativa das enzimas antioxidantes do Pratylenchus penetrans.</i> .....	25
3.2.3.1 <i>Ensaio de ação nematocida em P. penetrans com 3-octanol</i> .....	25
3.2.3.2 <i>Extração de RNA e síntese de cDNA de P. penetrans tratados com 3-octanol</i> .....	26
3.2.3.3 <i>Quantificação relativa das enzimas antioxidantes do P. penetrans por RT-qPCR</i> .....	26
3.3 EQUIPAMENTOS .....	29

3.4 REAGENTES .....	29
3.5 DIAGRAMA DO TRABALHO .....	30
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>42</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>43</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>49</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1.1</b> – Ciclo de vida dos nemátodes das lesões radiculares <i>Pratylenchus</i> spp. Imagem retirada de Jones and Fosu-Nyarko (2014) .....	12
<b>Figura 1.2</b> – Diferentes respostas imunes ativadas por reconhecimento da infecção. Adaptado de Torres (2006) .....	15
<b>Figura 1.3</b> – Interação entre as células da planta e o nemátode. Vias metabólicas associadas às espécies reativas de oxigénio (ROS). Adaptado de Gillet et al. (2017) .....	17
<b>Figura 1.4</b> – Envolvimento da via insulina/IGF-1 na resposta antioxidante. Adaptado de Gillet et al. (2017) .....	18
<b>Figura 3.1</b> – A curva sigmoide apresenta o <i>valor</i> $C_t$ como medida utilizada para a quantificação da expressão génica. Adaptado de (Bio-Rad, 2006) .....	28
<b>Figura 3.2</b> – Diagrama do trabalho .....	30
<b>Figura 4.1</b> – Amplificação dos genes que codificam os enzimas antioxidantes a partir de DNA. Na figura A estão representados: 1-2, SOD(g12753); 3-4, SOD(g8781); 5-6 TRX(g19833); 7-8, SOD(g8933); (9-10, GPX(g3649); 11-12, PRX (g18176); e (-), controlo negativo. Na figura B estão representados: 1, PRX(g18176); 2, TRX(g19833); 3, SOD(g8781); 4, SOD(g12753), 5, GPX(g3649), 6, CTL(g11092) e (-), controlo negativo .....	35
<b>Figura suplementar 1</b> – Alinhamento de sequências obtidas por sequenciação de Sanger A primeira sequência corresponde à sequência predita, sendo a segunda sequência a obtida por sequenciação. A cor-de-rosa encontram-se os nucleótidos não coincidentes, podendo isso ocorrer pela simples falta do nucleótido sequenciado que corresponda ao predito (-) ou por se tratarem de nucleótidos diferentes .....	52

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.1</b> – Caracterização dos nemátodes das lesões radiculares do género <i>Pratylenchus</i> . Adaptado de Jones and Fosu-Nyarko (2014) .....	11
<b>Tabela 3.1</b> – Lista de primers correspondentes aos genes de interesse. Nesta lista encontra-se informação sobre os primers para PCR e RT-PCR. As sequências dos primers estão na direção 5'-3'.....	24
<b>Tabela 3.2</b> – Quantificação do RNA total extraído de <i>P. penetrans</i> tratados com dH <sub>2</sub> O, 3-octanol e pelos próprios solventes, a acetona (ACE) e DMSO, característicos dos dois ensaios .....	26
<b>Tabela 4.1</b> – Análise <i>in silico</i> dos genes que codificam as enzimas antioxidantes do <i>Pratylenchus penetrans</i> .....	36
<b>Tabela 4.2</b> – Análise <i>in silico</i> das enzimas antioxidantes do <i>Pratylenchus penetrans</i> .....	37
<b>Tabela suplementar 1</b> – Quantificação (ng/µL) e qualidade (A260/280, A260/230) do DNA total extraído do nemátode <i>P. penetrans</i> pelos aparelhos NANODROP 2000 e QUBIT 4 .....	51
<b>Tabela suplementar 2</b> – Análise estatística dos ensaios de 3-octanol dissolvido em ACE e DMSO. Análise da variância ANOVA e teste Post HOC de Tukey. Determinação dos valores de expressão significativos (jamovi 2.3.26) .....	53

## Lista de Gráficos

- Gráfico 4.1** – Comparação da expressão relativa dos genes que codificam enzimas antioxidantes relativamente ao gene de referência actina (ACT) no ensaio de 3-octanol dissolvido em DMSO. Símbolos no topo das colunas indicam diferenças significativas, \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  ..... 41
- Gráfico 4.2** – Comparação da expressão relativa dos genes que codificam enzimas antioxidantes relativamente ao gene de referência actina (ACT) no ensaio de 3-octanol dissolvido em ACE. Símbolos no topo das colunas indicam diferenças significativas, \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  ..... 41



## **Lista de Abreviaturas**

*Ct*, cycle threshold (limite inferior detéctavel)

CTL, catalase

*DAMP*, damage-associated molecular patterns

*DMSO*, Dimetilsulfóxido

*DNA*, ácido desoxirribonucleico

*ETI*, effector triggered immunity (imunidade desencadeada por efetor)

*FAR*, proteínas de ligação do ácido retinóico

*FOXO*, Forkhead box class O

*Genes R*, genes de resistência

*GPX*, glutationa peroxidase

Kbp, kilo pares de bases

*NADP*, nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate

*DAF*, Complement decay accelerating factor

NLR, nemátodes das lesões radiculares

*P450*, citocromo P450

*PAMP*, pathogen-associated molecular patterns

PB, pares de bases

*PCR*, Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia de polimerase)

RT-qPCR, real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR em tempo real)

*PRDX*, peroxirredoxinas

*RH*, resposta de hipersensibilidade

*ROS*, reactive oxygen species (espécies reativas de oxigénio)

*RT*, reverse transcriptase

*SDR*, desidrogenase de cadeia curta

*SKN*, cap'n'collar transcription factor (factor de transcrição)

*SOD*, superóxido dismutase

*TBE*, Tris/Borato/EDTA (EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético)

## **Resumo**

O nemátode das lesões radiculares (NLRs) *Pratylenchus penetrans* é um nemátode fitoparasita migratório capaz de infetar mais de 400 culturas com interesse agrícola. Em Portugal, o *P. penetrans* ataca principalmente a cultura da batata. Atualmente, não existe uma solução satisfatória para mitigar os seus estragos. O fitoquímico 3-octanol, produzido naturalmente em *Origanum spp.*, *Thymus zygis* e *Mentha arvenses*, apresenta-se como uma possível solução neste sentido. Este trabalho teve como principal objetivo estudar o modo de ação como nematodocida do 3-octanol em *P. penetrans*, em particular o possível envolvimento da via antioxidante do nemátode. Foram estudados genes que codificam as principais enzimas antioxidantes do *P. penetrans* e avaliado a expressão dos mesmos na presença do composto nematodocida dissolvido em dois solventes (acetona, ACE; e dimetilsulfóxido, DMSO). O tratamento com 3-octanol, em ACE e em DMSO, provocou a inibição da transcrição de genes das vias antioxidantes à exceção do gene da tioredoxina no ensaio com ACE. Os próximos ensaios terão como foco as vias de detoxificação, às quais pertencem enzimas como a tioredoxina.

Esta estratégia engloba-se no desenvolvimento de controlos seletivos que, por norma, exigem menos recursos causando menos efeitos colaterais para ecossistemas, para a saúde humana e salvaguardando as culturas agrícolas das pragas e doenças.

## **Palavras-chave**

Compostos nematodocida; Nemátodes fitoparasitas; *Pratylenchus penetrans*; Stress oxidativo; 3-octanol.

## **Abstract**

The root lesion nematode (RLN) *Pratylenchus penetrans* is a migratory plant parasitic nematode, capable of infecting more than 400 different agricultural plants. In Portugal *P. penetrans* affects mostly potato fields. Currently, there is no sustainable solution to surpass the damage caused by this RLN. The phytochemical, 3-octanol, produced naturally by *Origanum* spp., *Thymus zygis* and *Mentha arvenses*, has shown promising results in biocontrol. The focus of this research is to investigate the mode of action of 3-octanol in the antioxidant pathway. Genes encoding the main antioxidant enzymes of *P. penetrans* were studied and their expression was evaluated in the presence of the nematicidal compound dissolved in two solvents (acetone, ACE; and dimethyl sulfoxide, DMSO). The treatment with 3-octanol, in ACE and in DMSO, inhibit the transcription of antioxidant pathway genes except for the thioredoxin gene in the ACE assay. Future assays will focus on genes involved in the detoxification pathway, such as the thioredoxin coding gene. This strategy comprises the development of selective controls, which are usually less resource demanding, minimising environmental damage, human health risk and providing new crop management strategies.

## **Keywords**

Nematicidal compounds, plant parasitic nematodes, *Pratylenchus penetrans*, Oxidative Stress; 3-octanol

## 1. Introdução

### 1.1 O impacto dos nemátodes fitoparasitas na agricultura

Os nemátodes fitoparasitas provocam danos nas plantas, interrompendo o seu metabolismo e crescimento (Poveda et al., 2018). A ação destes pode ainda ser agravada por agentes patogénicos secundários como vírus, bactérias ou fungos (Ruanpanun, 2010). Estima-se que causem um prejuízo de 173 mil milhões de dólares mundialmente (Gamalero and Glick, 2020). A quantificação e identificação dos danos causados pelos nemátodes fitoparasitas é dificultada pelo facto de em muitos casos estas culturas serem também afetadas por outras espécies invasivas (Singh et al., 2013).

O solo é um ambiente altamente complexo, pelo que a sobrevivência dos nemátodes dependem de possuírem uma cutícula resistente, intestino adaptado e sistemas de destoxificação eficientes (Avery and Shtonda, 2003), características que dificultam qualquer abordagem na sua eliminação. As soluções de controlo natural são de difícil implementação devido ao tempo de duração e ao possível *feedback* de proliferação de outros agentes patogénicos (Oka, 2010; Akhtar et al., 2000). No geral, as técnicas convencionais não funcionam para estes nemátodes pois causam danos excessivos no ambiente ou por apresentarem pouca eficácia (Dutta et al., 2019).

#### 1.1.1 O nemátode das lesões radiculares, *Pratylenchus* spp.

Os nemátodes das lesões radiculares (NLRs) do género *Pratylenchus* Filipjev, são nemátodes migratórios endoparasitas intracelulares que se movimentam pelos tecidos da raiz, alimentando-se das suas células (Tabela 1) (Gough et al., 2020). Os NLRs têm a capacidade de infetar uma grande variedade de hospedeiros, como por exemplo cereais, bananeira, café, legumes e outros (Castillo and Volvas, 2007). A sua entrada no hospedeiro dá-se por penetração na raiz em locais metabolicamente ativos como na área de divisão celular, onde exsudados estimulam o nemátode (Bell et al., 2019). Os danos causados pelos nemátodes migratórios são particularmente difíceis de identificar pela ausência de formação de padrões de alimentação característicos dos nemátodes sedentários e pela mobilidade exibida em todos os estágios de desenvolvimento dos NLRs (Jones and Fosu-Nyarko, 2014). O nemátode passa de raiz para raiz, com a ajuda de enzimas que atuam na parede celular e evadindo-se do sistema imune da planta destruindo as células por onde passa (Jones and Fosu-Nyarko, 2014; Vicente et al., 2019). Esta capacidade também permite a entrada de outros agentes patogénicos através das aberturas em locais danificados (Saeed et al., 1998). As raízes afetadas exibem lesões acastanhadas resultantes da entrada e saída dos

nemátodes, podendo-se levar a danos celulares extensivos e necroses. Como resultado, as plantas afetadas apresentam um sistema radicular pequeno, com atrofia. Os sintomas desenvolvidos na parte aérea da planta são a clorose e redução do crescimento, facilmente confundidos com a falta de nitrogénio ou murchidão por stress hídrico (Vicente et al., 2021). Os sintomas descritos podem ainda ser agravados por condições edafo-climáticas adversas (Vicente et al., 2021).

**Tabela 1.1** - Caracterização dos nemátodes das lesões radiculares do género *Pratylenchus*. Adaptado de Jones and Fosu-Nyarko (2014)

<b>Nemátodes das lesões radiculares</b>	
Especificidade do hospedeiro	Grande variedade de hospedeiros
Invasão	Ponta da raiz, zona de alongação, toda a superfície da raiz, todos os estágios; móveis são capazes de entrar e sair das raízes.
Migração	Intracelular
Células de alimentação	Pelos radiculares, células estomáticas e corticais não específicas que morrem no processo
Comportamento de alimentação	Alimentação transitória de diferentes células hospedeiras, sem formação do tubo de alimentação
Transição para célula de alimentação	Sem diferenciação
Tecido envolvente	Dano celular extensivo e necrose causada por alimentação destrutiva, invasão de patogénicos secundários do solo
Vascularização	Disrupção vascular causada pelo dano alimentar e infeções secundárias
Reprodução	Por partenogénese ou reprodução sexuada, postura de ovos apenas nas raízes ou no solo

A reprodução dos NLRs pode ser por partenogénese (assexuadamente) ou sexuada (Jones et al., 2013). O ciclo de vida dos NLRs pode variar entre as 3 e 8 semanas, dependendo da espécie e com as condições edafo-climáticas, (e.g., temperatura, humidade, solo). Os estágios de desenvolvimento são 6, começando com o ovo e prosseguindo para quatro juvenis (J1, J2, J3, J4) até ao estado adulto. Os estados J1 a J2 passam pelo ovo. A partir do J2, o nemátode eclode e passa a ser móvel podendo apresentar-se na superfície ou adjacente à raiz. Na maior parte da sua vida está dependente e apresenta-se no interior da raiz. O seu alimento são as células epidérmicas e corticais da raiz. Na sua reprodução, as fêmeas podem depositar os ovos na superfície ou dentro da raiz (Jones and Fosu-Nyarko, 2014).

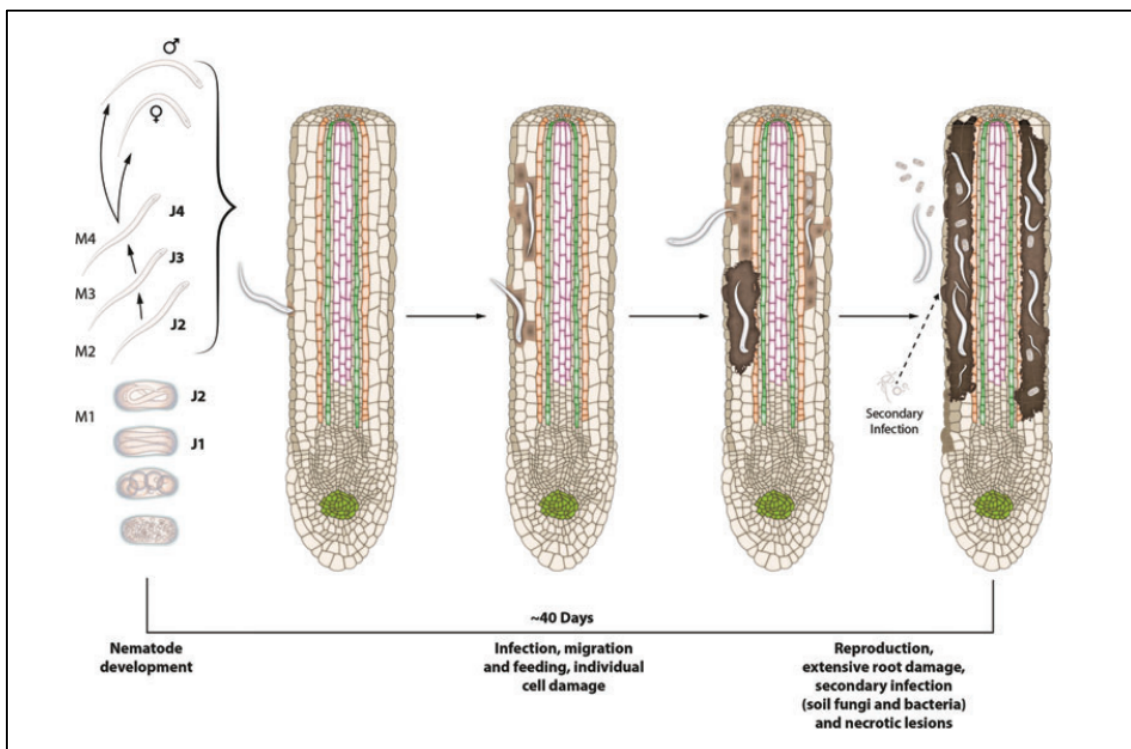


Figura 1.1- Ciclo de vida dos nemátodes das lesões radiculares *Pratylenchus* spp. Imagem retirada de Jones and Fosu-Nyarko (2014).

### 1.1.2 Controle dos nemátodes das lesões radiculares

No geral, os nemátodes fitoparasitas são conhecidos por serem de difícil controle devido à dificuldade na sua quantificação da extensão da infecção, facilmente atribuída a outros organismos patogênicos ou a deficiências nutricionais das culturas (Chitwood, 2002). Algumas espécies são ainda conhecidas por sobreviver a condições adversas e após a colheita da planta, podendo permanecer por longos períodos no estado de ovo ou em anidrobiose (latência causada pela falta de água) (Castillo and Volvas, 2007). As abordagens mais comuns para o controle destes parasitas consistem nas boas práticas agrícolas, como rotação de culturas ou a utilização de plantas resistentes e aplicação de químicos nematocidas fumigantes com baixo peso molecular e aplicação de organofosfatos no solo (Castillo and Volvas 2007). Uma das formas de mitigação dos NLRs é utilização de adubagem verde e rotação de culturas nematotóxicas como forma de incorporar fitoquímicos na prática de gestão (Chetia et al., 2019). A adubação verde permite a supressão de ervas e a ausência da aplicação de grandes quantidades de pesticidas. Apesar destas vantagens, por outros fatores esta abordagem acaba por não ser tão rentável como a utilização de métodos convencionais. Existem os exemplos da rotação de culturas com efeitos satisfatórios em tagetes (*Tagetes* spp.) e tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Reynolds et al., 2000). As plantas *Tagetes* spp. têm utilidade enquanto plantas

antagonistas, mas o seu uso é restrito pela sensibilidade da planta ao clima (Hamaguchi et al., 2019). A sua ação foi estudada, nomeadamente o composto  $\alpha$ -tertenil que foi reconhecido pela atividade nematodocida (Hamaguchi et al., 2019).

O desenvolvimento de novos nematodocidas é um desafio. Um dos obstáculos é a dificuldade em atingir o nemátode no seu local habitual segundo o autor original (Thomas WB 1996) citado por (Chitwood, 2002). O alvo da aplicação dos químicos acaba por ser distante do local de aplicação. O nemátode também possui uma cutícula impermeável a muitas moléculas orgânicas, razão pela qual os nematodocidas tendem a ser particularmente tóxicos ou voláteis para o ambiente (Thomas WB, 1996). Existem igualmente os compostos desenvolvidos por químicos orgânicos que têm, em raras ocasiões, obtido atividade superior à dos fitoquímicos (Chitwood, 2002) Apesar de poder haver eficácia *in vitro* para estágios específicos da vida de certas espécies de nemátode, a utilização na agricultura de alguns destes compostos não vingou devido à complexidade do solo e a outras considerações na sua utilização (Chitwood, 2002).

Uma estratégia seguida por vários grupos de trabalho consiste no desenvolvimento de fitoquímicos cuja ação tende a replicar mecanismos já encontrados naturalmente (Chitwood, 2002). Os produtos desenvolvidos podem ser repelentes, atraentes, estimulantes ou inibidores de eclosão, nematodocidas constitutivos ou indutivos (Ntalli et al., 2012). A aleloquímica, o estudo da mediação química entre plantas e outros organismos aplicada à relação do nemátode com a planta envolve, para os propósitos de biocontrolo, a procura por substâncias antagonistas de nemátodes que podem estar presentes na natureza. Esta pesquisa poderá levar ao encontro de um produto apelativo ao público tendo, para isso, de ser amigo do ambiente, barato e com utilidade agronómica (Chitwood, 2002).

## **1.2 O papel do stress oxidativo nos mecanismos de defesa contra os nemátodes fitoparasitas**

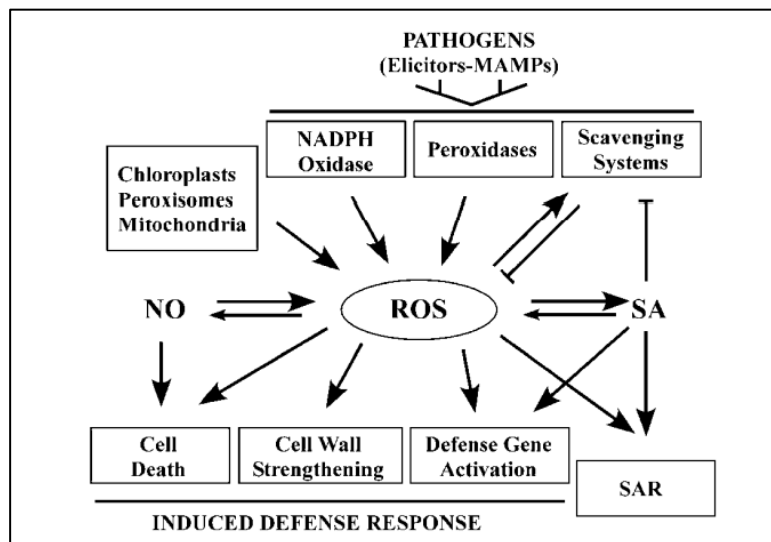
### *1.2.1 Mecanismos de defesa das plantas*

Os mecanismos de defesa das plantas contra organismos patogénicos, vulgarmente designados como mecanismos de defesa inata das plantas, baseiam-se em dois tipos diferentes de resposta: i) na perceção do padrão molecular associado aos organismos (em inglês, *pathogen associated molecular patterns*, PAMP) ou por reconhecimento à superfície celular de padrão (em inglês, *damage-associated molecular patterns*, DAMP), levando à resposta basal; e ii) no reconhecimento de efectores patogénicos por domínio nuclear rico em lisina, cujo reconhecimento leva a uma imunidade desencadeada por efector (em inglês, *effector triggered immunity*, ETI) (Boutrot and Zipfel 2017; Hou et al., 2019; Vieira et al., 2021). A sequência de respostas em que entram estes mecanismos é conhecida como o modelo “zig-zag” (Burgh et al.,

2019). Os mecanismos de defesa constitutivos e respostas induzíveis participam num sistema paralelo elaborado e complementar. As biomoléculas e mecanismos identificados são variados. Entre os quais: secreção de enzimas com ação nematocidas no apoplasto, produção de compostos nematotoxicos, reforço da parede celular como barreira física, libertação de espécies reactivas de oxigénio (em inglês, *reactive oxygen species*, ROS), libertação de ácido nítrico e inibição de proteases envolvidas na morte celular associada ao desenvolvimento de nemátodes (Sato et al., 2019). Formas constitutivas de defesa incluem a resistência pré-penetração e metabólica. A resistência pré-penetração faz com que se impossibilite a penetração do hospedeiro na ausência do padrão de reconhecimento ou presença de barreira física impenetrável (Lee et al., 2017). Na interação pré-penetração os nemátodes segregam moléculas chamadas ascarídeos (Manohar, 2020). Estas são feromonas exclusivas do *phylum Nematoda* que desencadeiam a resposta imune basal a níveis nanomoleculares segundo o autor original (Choe, 2012) citado por (Gillet et al., 2017). Estes compostos são continuamente segregados e encontram-se difundidos na rizosfera desencadeando a resposta na planta sem o contacto prévio.

O nemátode penetra nas paredes celulares por ação de enzimas (Gillet et al., 2017). Depois da entrada bem-sucedida, o reconhecimento de efectores desencadeia a resposta basal (Torres, 2006). Esta é caracterizada pela libertação de fitoquímicos tóxicos denominados fitoalexinas, distintas das fitoanticipinas que são compostos presentes constitutivamente (Ube et al., 2019) A libertação de ROS, nitrogénio reativo e outras moléculas do metabolismo secundário fazem parte do processo de defesa basal (conforme a Figura 2) (Holbein et al., 2016). Os ROS possuem propriedades antimicrobianas e regulatórias. Alguns efeitos da libertação dos ROS intracelular e intercelular são a mediação de ativação das defesas (Holbein et al., 2016) como a resposta hipersensível (RH) (Kadota et al., 2015) e fortalecimento da parede celular. Ao nemátode, os ROS causam dano oxidativo como por exemplo, a peroxidação lipídica e dano membranar (Morsy et al., 2019)





**Figura 1.2** - Diferentes respostas imunes ativadas por reconhecimento da infecção. Adaptado de Torres (2006).

No mecanismo por genes de resistência R, a imunidade desencadeada via a ligação efector-núcleo, ocorre apenas em plantas com imunidade específica (Torres, 2006). As quitinases, associadas aos genes R, atuam na quitina, o principal constituinte na cutícula do ovo e no lúmen da faringe do *Caenorhabditis elegans* (Zhang et al., 2005). Verifica-se também o aumento da taxa de transcrição e atividade, deste enzima perante uma infecção em plantas resistentes (Bagnaresi et al., 2013). O conhecimento destes sistemas ainda está a ser desenvolvido, apesar da existência de um certo grau de conservação em vários sistemas já conhecidos pelo reino vegetal (Sato et al., 2019). Um aspeto importante a ter em conta é a supressão da defesa do hospedeiro por fatores de virulência (Cui et al., 2015). Por exemplo, o Gr-VAP1, um efector produzido por nemátodes, atua na inibição da RCR3pim, uma peptidase semelhante à papaína cistaínica (Lozano-Torres et al., 2012). Contudo, o recetor plasmático da planta, o cf-2, reconhece a atividade do Gr-VAP1, desencadeando a morte celular (Rooney et al., 2005).

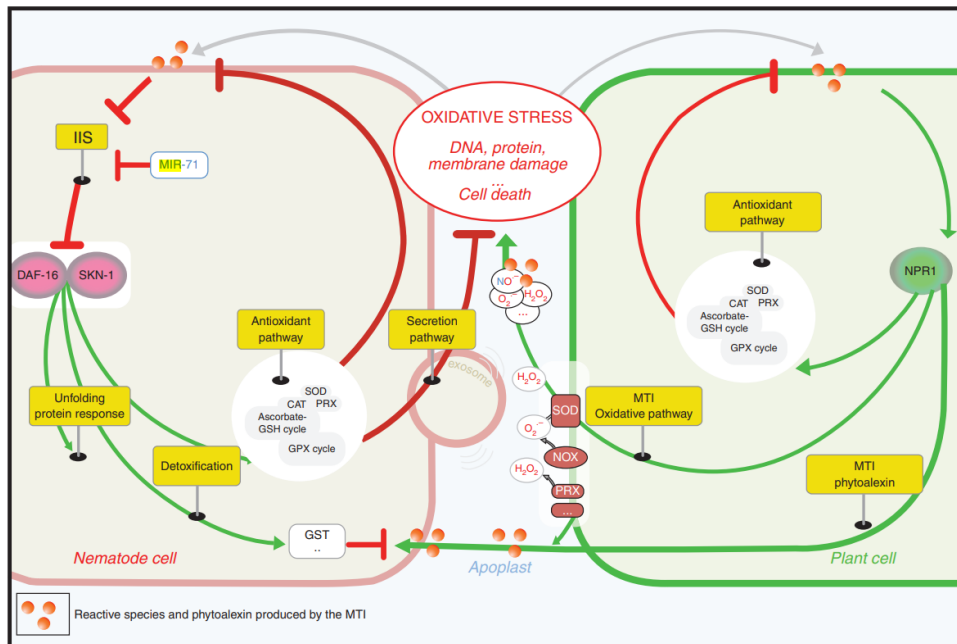
Diversos metabolitos secundários com bioatividade distinta foram estudados na sua ação nematocida, seguem-se alguns exemplos (Zhou et al., 2012). Existe o caso do ácido clorogénico que surge após a infecção em várias plantas, mas que possui pouca atividade nematocida. Em comparação, os produtos específicos da sua metabolização em cada planta são altamente nematocidas (Sato et al., 2019). Compostos fenólicos como o anigofurone, encontrados no local de infecção, contêm elevada atividade nematocida. A sua atividade foi associada à formação de complexos lípido-anigofurone nos corpos de *Radophilus similis* (Dhakshinamoorthy et al., 2014; Hölscher et al., 2014). Outros metabolitos nematocidas como os flavonoides são produzidos por plantas. Estes podem ser nematoestáticos, repelentes ou inibidores de eclosão (Chin et

al., 2018). Por exemplo, verifica-se a acumulação de gliceolina, uma fitoalexina pertencente aos pterocarpanos prenilados, expressa na infecção em soja resistente (Kaplan et al., 1980). O isómero, glicoeolina I acumula-se ao redor da cabeça do nemátode dos quistos, sugerindo que a resposta é local e temporalmente restrita (Huang and Barker, 1991). Para além dos compostos fenólicos, outros estão associados a este tipo de resistência (Gommers and Bakker, 1988; Wang et al., 2007; Faizi et al., 2011). Plantas como a malmequer e espargos têm sido utilizadas na redução da população de nemátode no solo. Os malmequeres produzem na sua raiz o  $\alpha$ -tertenil, conhecido por induzir stress oxidativo (Hamaguchi et al., 2019).

### 1.2.2 Stress oxidativo

De modo geral os efeitos diretos dos ROS nas biomoléculas são a carbonilação de proteínas, subprodutos dos ácidos nucleicos e peroxidação lipídica (Sahu et al., 2022). Os ROS são produtos secundários do metabolismo, em particular a fotossíntese e num conjunto de enzimas membranares que produzem ROS direcionado para o apoplasto (conforme a Figura 3) (Karpinski, 2003; Apel and Hirt, 2004). De entre essas estão a NADPH oxidase e peroxidases (Torres et al., 2016). Por exemplo, a fotossíntese está associada à produção de ROS envolvida nas respostas de hipersensibilidade (RH) (Goodman and Novacky, 1994). No caso, genes R medeiam a resposta por interrupção do processo de fotossíntese ao nível dos peroxissomas e cloroplastos (Tang, 1998). O resultado é a acumulação de ROS e desregulação da homeostase que pode levar ao sacrifício da célula, morte celular (Tang, 1998).

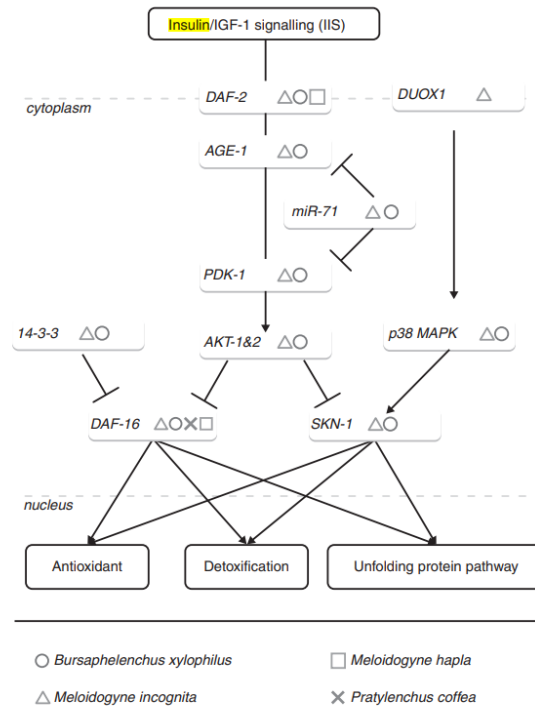
A resposta por ROS está caracterizada por duas fases. Na fase inicial de infecção, após o reconhecimento, a planta gera ROS, nitrogénio reativo e moléculas tóxicas do metabolismo que são libertas para o apoplasto (Doke 1983; Auh and Murphy 1995; Grant, 2000). Para se protegerem os nemátodes possuem mecanismos de defesa em que integram várias famílias de enzimas, nomeadamente superóxido dismutases (SOD), as glutacionas peroxidases (GPX), as catalases (CTLs) e peroxirredoxinas (PRDX) (Vanfleteren e De Vreese, 1995; Honda and Honda, 1999; Oláhova and Veal, 2015). As SODs transformam o radical superóxido em oxigénio ou em peróxido de hidrogénio que são substratos da CTLs (Sarkar and Oba, 2018). As enzimas do metabolismo da fase II como as glutationa-S-transferase (GST) e gluconosil transferases (UDP) transformam agentes reativos e xenobióticos pela conjugação de agentes redutores (Xu et al., 2020). Um dos efeitos adversos da resposta antioxidante é o vasto consumo de NADPH e GSH e conseqüente redução do meio e intoxicação. (Gillet et al., 2017).



**Figura 1.3** - Interação entre as células da planta e o nemátode. Vias metabólicas associadas às espécies reativas de oxigênio (ROS). Adaptado de Gillet et al. (2017).

Para além das respostas já referidas, os ROS induzem modificação de proteínas, destoxificação e vias antioxidantes moduladas a montante pela via insulina-IGF-1 (conforme a Figura 4) (Gillet et al., 2017). A jusante desta, os fatores de transcrição DAF, e SKN-1 ligados à atividade de enzimas na via antioxidante e de destoxificação são o alvo de intenso estudo pela encruzilhada que aparentam envolver (Gillet et al., 2017). A via DAF foi alvo de análise por mutagénese, o que resultou no encontro de genes específicos, implicados no parasitismo (Fielenbach e Antebi, 2008). A fase “dauer”, com uma resistência stress oxidativo 20 vezes superior à adulta (Larsen 1993), está ligada exclusivamente á via DAF-16 (Albarqi et al., 2016). Este caso implica o envolvimento da via DAF (Complement decay accelerating factor) no progresso de estágios do desenvolvimento em *C. elegans* (Goverse and Smant, 2014; Schindler e Sherwood, 2014). Poderá ser generalizada a mesma associação para outras fases do desenvolvimento e outras espécies, de acordo com o modelo “*should i stay or should i go*” (Murphy and Hu, 2013), um modelo que defende que as fases do desenvolvimento têm pontos chave na sua progressão. O fator de transcrição SKN-1 é o ortólogo do *C. elegans* da proteína Nrf, conhecida em mamíferos pelo seu papel na longevidade, metabolismo oxidativo e resposta a xenobióticos (Bin-Jumah et al., 2022). Exemplos de enzimas envolvidas na via DAF e SKN-1 são as já referidas CTLs e a SODs (Lin et al., 2019). Associada à via SKN-1 está a ativação da GPX (Tyagi et al., 2022). Também modulada pelas vias DAF e SKN-1, a desintoxicação de xenobióticos processa-se em três fases. A fase 1 envolve o citocromo p450 e SDR (desidrogenase de cadeia curta).

Na fase 2, acrescentam-se grupos funcionais ou suprimem-se os xenobióticos. Enzimas característicos desta fase são a GSTs e UDP- transferase (Dubreuil et al., 2007). Na fase 3, os produtos resultantes são exportados por transportadores *ATP-binding cassette* (Gillet et al., 2017).



**Figura 1.4** - Envolvimento da via insulina/IGF-1 na resposta antioxidante. Adaptado de Gillet et al. (2017)

Na manutenção da proteostase, genes complementares são ativados (conforme a figura 4) (Grushko et al., 2021). Estes incluem genes que codificam proteínas de choque térmico e de estabilização de proteínas (Grushko et al., 2021). Durante o ataque por ROS, as tioredoxinas dissulfeto e isomerases de dissulfato participam na manutenção das ligações sulfato em proteínas (Cutter et al., 2013).

## **2. Problema e Objetivos**

### **2.1 Problema**

Os nemátodes das lesões radiculares (NLRs), do género *Pratylenchus* Filipjev, são nemátodes migratórios endoparasitas intracelulares que se movimentam pelos tecidos da raiz e se alimentam das suas células (Jones and Fosu-Nyarko, 2014; Vicente et al., 2021). O nome dado aos NLRs provem da observação de danos causados nas raízes provocados pela sua passagem. A sua distribuição geográfica é ampla, adaptando-se a diferentes climas. Em Portugal, os NLRs afetam diferentes culturas, como por exemplo a cultura da batata ou plantas ornamentais (Rusique et al., 2020; Vicente et al., 2021). O *Pratylenchus penetrans* está entre as 101 espécies do género *Pratylenchus*, sendo uma das mais devastadoras devido ao elevado número de hospedeiros que pode afetar (Vieira et al., 2018; Vicente et al., 2021). As culturas agrícolas, plantas ornamentais, árvores de fruto e culturas industriais podem ser hospedeiras deste parasita (Vieira et al., 2015). O impacto económico dos NLRs ocupa o terceiro lugar no ranking mundial entre os nemátodes fitoparasitas, estimando-se perdas anuais no valor 100 mil milhões de dólares (Kushida and Kondo, 2015). No topo deste ranking, encontram-se os nemátodes dos quistos, *Globodera* e *Heterodera*, seguindo-se aos nemátodes das galhas radiculares do género *Meloidogyne* (Jones et al., 2013). Com a disponibilidade de nematodocidas registados a decrescer, torna-se importante o desenvolvimento de alternativas sustentáveis na proteção das culturas de forma a minimizar os danos. O desenvolvimento de novos nematodocidas com uma abordagem focada nas interações entre parasita e hospedeiro poderá ser uma medida de interesse para resolver o problema (Wang, 2007).

### **2.2 Objetivos gerais**

Este estágio teve como principal objetivo estudar o modo de ação do composto bioativo 3-Octanol no nemátode das lesões radiculares *Pratylenchus penetrans*, mais especificamente o efeito na via antioxidante. Foram utilizadas técnicas de Nematologia, e Biologia Molecular.

## 2.3 Objetivos específicos

### Conhecer e compreender

- A importância do controlo dos nemátodes fitoparasitas na agricultura;
- O impacto do *Pratylenchus penetrans* nas culturas agrícolas;
- Os mecanismos de defesa do *Pratylenchus penetrans*, especificamente, nas vias antioxidantes e de destoxificação;
- O modo de ação do composto bioativo 3-octanol no nemátode das lesões radiculares *Pratylenchus penetrans*;
- Os protocolos experimentais para extração de DNA e RNA de nemátodes;
- Os protocolos experimentais para amplificação de genes por PCR;
- Análise bioinformática de sequências;
- O protocolo experimental para avaliar a expressão relativa por RT-qPCR.

### Dar valor

- Ao composto 3-octanol;
- Ao conhecimento sobre as vias metabólicas antioxidantes.

### Aplicar

- Técnicas de Nematologia e Biologia molecular,
- Análise e interpretação dos dados;
- Rotinas de trabalho, os procedimentos, organização e princípios necessários à obtenção de resultados;
- Cuidados no manuseamento de material genético e reagentes;
- Conhecimentos adquiridos de bioinformática para análise de sequências;
- Conhecimentos de análise estatística com o objetivo de compreender os resultados obtidos na expressão relativa das enzimas antioxidantes

### 3. Metodologia

#### 3.1 Estratégia

**Local de realização:** Laboratório de Nematologia sediado no Pólo da Mitra, Universidade de Évora.

**Apoio financeiro:** Projecto PratyOmics (PTDC/ASP-PLA/0197/2020) - Metabolómica de plantas para o controlo do nemátode das lesões radiculares *Pratylenchus penetrans*

**Duração:** 1 semestre letivo.

**Modelo biológico:** Nemátode de lesões radiculares, *Pratylenchus penetrans*, isolado A44L4.

#### Ensaio

- Validação da presença de genes identificados no genoma e transcriptoma do *P. penetrans*.
- Expressão relativa dos genes que codificam enzimas antioxidantes pela exposição do *P. penetrans* ao 3-octanol.

#### Parâmetros analisados

- Análise de sequências;
- Quantificação da concentração de DNA e RNA;
- Amplificação de genes de interesse por PCR;
- Análise da expressão relativa por RT-qPCR;

#### Técnicas utilizadas

- Extração de DNA e RNA
- Análise de ácidos nucleicos por Fluorometria e Espectrofotometria
- Purificação de produtos de PCR usando EXOSAP
- Purificação de produtos de PCR usando kit de purificação (produto de PCR ou de gel)
- Análise de sequências obtidas por sequenciação Sanger
- Extração de RNA e obtenção de cDNA
- Amplificação de genes por PCR
- Eletroforese em gel de agarose
- Avaliação da expressão relativa de genes por RT-qPCR

## 3.2 Procedimento Experimental

### 3.2.1 Análise *in silico* dos genes que codificam enzimas antioxidantes de *Pratylenchus penetrans*

As sequências preditas de gDNA e cDNA dos genes de *P. penetrans* pertencentes às vias metabólicas do stress oxidativo e de destoxificação foram exploradas em bases de dados internas do laboratório (genoma e transcriptoma do *P. penetrans*) (Vieira et al., 2015). As seguintes informações foram analisadas com recurso a ferramentas bioinformáticas: a) estrutura exão-intrão através do programa “CLC sequence viewer 8” e do software online *Exon–Intron Graphic Maker* (<http://wormweb.org/exonintron>); b) identificação por similaridade das sequências de gDNA e cDNA a partir da base de dados BLASTx NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); c) predição da sequência de aminoácidos através da ferramenta EXPASY (<https://web.expasy.org/translate/>); d) identificação por similaridade da sequência de aminoácidos predita BLASTp, Uniprot (<https://www.uniprot.org>) e *Wormbase parasite* (<https://parasite.wormbase.org>); e) predição da presença de sinal peptídico nas sequências de aminoácidos através do software SignalP 5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>); f) determinação do ponto isoelétrico e massa molecular no software *peptide mass* da EXPASSY ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)); g) caracterização dos domínios funcionais e reação enzimática a partir das bases de dados InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/sequencesearch/iprscan>) e ScanProsite (Sigrist et al., 2013) (<https://prosite.expasy.org/scanprosite/>).

### 3.2.2 Validação dos genes que codificam enzimas antioxidantes de *Pratylenchus penetrans*

#### 3.2.2.1 Extração do DNA total

Para a extração de DNA total de *P. penetrans* foram utilizados dois microtubos de 2mL com suspensões de nemátodes em diferentes estados de desenvolvimento. A amostra em suspensão foi centrifugada para retirar o excesso de sobrenadante, e macerada com o auxílio de um *pestle*. A extração foi realizada nos kits de extração *pepGOLD Blood & Tissue DNA Mini Kit* (VWR) e *NYZ tissue gDNA isolation kit* (NZYTech). Os protocolos de extração são semelhantes, apenas variando o tipo e nome das soluções tampão utilizadas. Para cada tubo, adicionaram-se 200µL de tampão TL e tornou-se a macerar. Adicionaram-se 25µL de proteinase K (20°C) e agitou-se no vortex. A mistura foi colocada no termobloco à temperatura de 55°C e agitação de 350 rpm durante 1h30. O lisado obtido foi centrifugado a 135000 rpm durante 5 min e o



sobrenadante retirado com uma micropipeta p1000 para um microtubo de 1,5mL. De seguida adicionaram-se 220µL de tampão BL e levou-se o tubo para o termobloco a 70°C durante 10min. Foram inseridas as colunas giratórias pepGOLD DNA Mini column em tubos de recolha de 2mL, fornecidos pelo kit. A amostra foi vertida, na sua totalidade, para a coluna e esta foi centrifugada a 135000 rpm durante 1min. O sobrenadante foi descartado. Adicionou-se à coluna, diluído em isopropanol 100% (v/v), centrifugando-se a 135000 rpm durante 30s. Num novo tubo de recolha, a amostra foi lavada por 700µL de solução tampão DNA *wash* diluída em etanol 100% (v/v) e centrifugada a 135000 rpm durante 30 s. Foi repetida a lavagem anterior. Em seguida foi centrifugada a coluna vazia a 135000 rpm para secagem da coluna. Por fim foram adicionados 50µL da solução tampão de eluição a 70°C ao filtro da coluna e esperou-se aproximadamente 2 min, até se centrifugar a 135000 rpm durante 1 min. Foram obtidos aproximadamente 45µL de amostra purificada em cada tubo.

A qualidade e quantidade de DNA total extraído foi verificado por fluorometria, com a utilização do Qubit 4.0 (199 µL reagente Qubit 1x dsDNA HS para 1 µL de amostra) (Thermo Fisher) e por espectrofotometria com o aparelho Nanodrop 2000C através das relações entre os comprimentos de onda (nm) 260/280 e 260/230.

### 3.2.2.2 Amplificação dos genes de interesse por PCR

Para a validação dos genes preditos, foram desenhados *primers* a partir das sequências de DNA e cDNA como molde no software online NCBI *primer-blast* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). O *primers* desenhados foram sintetizados pela empresa STABVIDA (Costa da Caparica) (Tabela 2). Para cada gene de interesse, realizou-se amplificação por PCR a partir do DNA total extraído. Preparou-se uma mistura constituída por 6,25 µL de NYZ taq II, 0,8 µL de *primer forward*, 0,8 µL de *primer reverse*, 0,65 µL de água esterilizada e 4 µL de amostra, perfazendo um total de 12,5 µL. O programa de amplificação foi: desnaturação inicial a 95°C durante 3 min; 35 vezes, desnaturação 94°C durante 30 s, emparelhamento a 45°C (PRXg18176, TRXg19833 ou 52°C (SOD g8781, SOD g81753, SOD g8933, GPX g3649) durante 30 s, e a 72°C e 1 min para o alongamento; por fim, a extensão final foi a 72°C durante 10 min.

**Tabela 3.1** - Lista de primers correspondentes aos genes de interesse. Nesta lista encontra-se informação sobre os primers para PCR e RT-PCR. As seqüências dos primers estão na direção 5'-3'.

gene	técnica	Primers	Seqüência	tamanho de amplicon (bp)
Actina	qPCR	for	TGGCATCCACGAGACTTCAT	170
		rev	CCAATGCGGTGATCTCCTTC	
PRX g18176	PCR	for	ATGAGCACCAACAGCAAAG	914
		rev	ATTGCTTGTGAAGTAGTCC	
	qPCR	for	ATGGCATCGCATTCCGTGGT	191
		rev	GGTTTGATTGTGTCGCCGCC	
SOD g8781	PCR	for	ACAATGCTTTGGAGCCGGTA	403
		rev	ATAGCCAAGCCATCCCAAC	
	qPCR	for	GAGCCGGTAATCGCAACGGA	131
		rev	TGGCTGTGCGAATGTCACCT	
SOD g12753	PCR	for	TTTGTGTGCTCGTAGGCGAT	806
		rev	ATCGATTTTGGCCACCCCAT	
	qPCR	for	AACAACGCGCGGTTTGTGTG	192
		rev	GTGGACCGCGGAAGTACAG	
TRX g19833	PCR	for	ATGCCCATCAAGTTCCTACAAA	885
		rev	TACTCGTAGAATGACATCCA	
	qPCR	for	GCAACAGCAGCACCAGCAAA	172
		rev	GTTTTGGGGTGAATGCGCGG	
GPX g3649	PCR	for	CTGCCAATCCAGCGTTTCC	990
		rev	TTGGGGTACTGTCTGTGGG	
	qPCR	for	TGGCTGTGGAATGCCGAGG	121
		rev	ATGGCCGGGATGTATTGGC	
CTL g7050	PCR	for	GCAAAAGGGTTTGGGGCAAT	2020
		rev	TTCATTACGGCTCGTTCCT	
CTL g11092	qPCR	for	CGCGTCAACAACCCCAAT	170
		rev	TCAATTTGGCCGGACTCGAA	

### 3.2.2.3 Electroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR foram visualizados através da técnica de electroforese em gel de agarose 1% (w/v) em tampão TBE 0,5X. Para um volume de 50-100mL de gel, adicionou-se 1µL de agente intercalante NYZ *green safe premium* (NZYTech). A mistura foi vertida num berço, adicionou-se um pente de 20 poços e deixou-se repousar durante aproximadamente 30-40min. Posteriormente, o gel foi colocado numa tina de eletroforese horizontal ligada a uma fonte de energia Power Source 500V (VWR). Cerca de 8 µL de amostra em cada poço e um marcador molecular de tamanho 1Kbp. A corrida foi feita com uma corrente de 300mA e um potencial de 80-90V durante 40min. A revelação da imagem foi feita através do transiluminador de luz ultra-violeta (UV) (Genoview, VWR) e foto documentada numa Canon PowerShot g10.

### 3.2.3.4 Purificação dos produtos de PCR, sequenciação e análise de seqüências

Na purificação dos produtos de PCR foram utilizados dois kits, nomeadamente o *MinElute PCR purification kit* (Qiagen) para produtos de PCR de banda única, e o *MinElute Gel Extraction kit* (Qiagen) para produtos de PCR com múltiplas bandas. Para

ambos os kits, utilizou-se o procedimento indicado no respetivo kit. Por exemplo, para os genes SOD g12753, GPX g3649 e CTL g11092 utilizou-se o MinElute Gel Extraction kit (Qiagen). As bandas foram cortadas do gel com a ajuda de um bisturi, e colocados num microtubo de 2mL, previamente tarado na balança analítica. Foram registadas as massas de cada amostra e adicionou-se um volume de tampão QG três vezes superior ao do gel (100mg gel  $\approx$  100 $\mu$ L), na proporção de 1:3 (1 volume de gel para 3 volumes de tampão). A mistura foi incubada no termobloco à temperatura de 50°C, e periodicamente misturado no vortex até se dissolver. Adicionou-se 10 $\mu$ L de solução acetato de sódio (pH 5,2  $\pm$  1,3; 3M) e um volume igual ao do gel de isopropanol. A mistura foi posta numa coluna, inserida num microtubo de 2mL fornecido pelo kit, centrifugada a 13000rpm durante 1min e o sobrenadante obtido foi descartado. No mesmo tubo adicionaram-se 500 $\mu$ L de solução tampão QG e centrifugou-se a 13000 rpm durante 1min, descartando-se o sobrenadante. No mesmo tubo, adicionaram-se 750 $\mu$ L de tampão PE e centrifugou-se a 13000rpm durante 1min, descartou-se o sobrenadante e voltou-se a centrifugar nas mesmas condições. A coluna foi colocada num microtubo de 1,5mL e adicionaram-se, diretamente sobre a membrana, 10 $\mu$ L de solução BE (10mM tris-Cl, pH 8,5). Aguardou-se 1min à temperatura ambiente. De seguida foi centrifugada a 13000rpm durante 1 min sendo recuperado o sobrenadante.

Para a sequenciação do produto de PCR purificado, adicionou-se 3 $\mu$ L de *primer* "forward" de cada gene a 10 $\mu$ L de produto. Cada microtubo de 1,5mL foi etiquetado e enviado para a Stabvida Lda (Portugal). Os resultados foram interpretados no programa Bioedit v7.2 (Hall T.A., 1999). Posteriormente, as sequências obtidas foram alinhadas com as sequências inicialmente previstas para verificação da percentagem de similaridade.

### 3.2.3 Estudo do efeito do composto 3-octanol na expressão relativa das enzimas antioxidantes do *Pratylenchus penetrans*

#### 3.2.3.1 Ensaios de ação nematocida em *P. penetrans* com 3-octanol

Os ensaios de ação nematocida em *P. penetrans* foram realizados anteriormente no Nemalab (Barbosa et al., 2022). Foram testados 2 solventes apolares para dissolução do 3-octanol, nomeadamente sulfóxido de dimetilo (DMSO) (a uma concentração final de 0,1% v/v), e acetona (ACE) (a uma concentração final de 1% (v/v)). O composto 3-octanol foi testado à concentração de 2mg/mL. Resumidamente, cerca de 10000 *P. penetrans* (de diferentes estádios de desenvolvimento) foram colocados em contacto com 3-octanol durante 30min, tempo suficiente para induzir modificações moleculares sem provocar morte. Após o período de incubação, os

nemátodes foram lavados com água destilada, centrifugados a 5000rpm durante 5min, e armazenados a -80°C.

### 3.2.3.2 Extração de RNA e síntese de cDNA de *P. penetrans* tratados com 3-octanol

Procedeu-se à extração do RNA total dos nemátodes armazenados a - 80°C com o *RNEasy RNA mini kit* (QIAGEN), seguindo as indicações descritas. O RNA foi eluído em 50uL de água ultrapura DEPC, e a sua concentração medida por espectrofotometria através do Nanodrop (Tabela 3).

**Tabela 3.2** - Quantificação do RNA total extraído de *P. penetrans* tratados com dH<sub>2</sub>O, 3-octanol e pelos próprios solventes, a acetona (ACE) e DMSO, característicos dos dois ensaios.

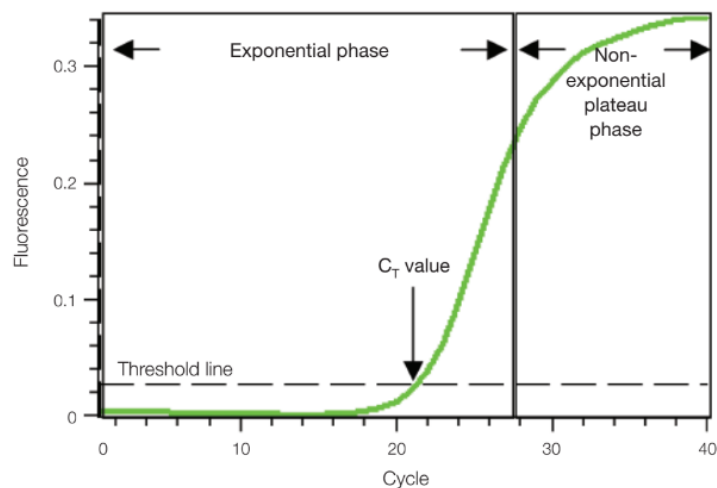
<b>Ensaio</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Concentração (ng/uL)</b>
ACE	dH <sub>2</sub> O	17,1
	ACE	5,5
	3-octanol	19,1
DMSO	dH <sub>2</sub> O	37,6
	DMSO	34,6
	3-octanol	59,0

Para a síntese de cDNA de cadeia simples foi utilizado o kit *Super Script III first strand synthesis system* (Invitrogen), seguindo as indicações do protocolo. Para preparar cDNA a uma concentração de 50-100ng, misturou-se num tubo de 1,5mL cerca de 3-10 µL de RNA (Tabela 3), 1µL de mistura de oligonucleótico dt20, 1µL de mistura NTP e água destilada até perfazer 10µL. A mistura foi levada a incubar no termociclador a 65°C durante 5min e depois, posta imediatamente numa placa gelada. De seguida adicionou-se 2µL de tampão RT 10x, 4µL (cloreto de magnésio 25mM), 2 µL (DTT 0,1M), 1 µL (RNase out) e 1 µL de Superscript III. A mistura foi incubada a 50°C durante 50 min e de seguida a 85°C durante 5 min. Por fim, foi adicionado 1µL de RNase II e a mistura foi incubada a 37°C durante 20 min. Os *primers* anteriormente desenhados (Tabela 2) foram validados por PCR usando como template o cDNA sintetizado. As condições de PCR foram as mesmas anteriormente descritas.

### 3.2.3.3 Quantificação relativa das enzimas antioxidantes do *P. penetrans* por RT-qPCR

O *real-time quantitative PCR* (RT-qPCR) é um método analítico de amplificação de cDNA utilizando como molde para a sua síntese, o RNA de um organismo sujeito a um dado estímulo. A quantidade de registada fica desse modo associada expressão génica de sequências alvo perante o estímulo, associando assim a ontologia à regulação

génica. Em particular, os estímulos neste estudo são a exposição ao 3-octanol dissolvido em ACE ou DMSO. A condição controlo corresponde à exposição a água (ausência de estímulo). O número de ciclos de amplificação, face à fluorescência emitida pelo corante, é representado numa curva sigmoide (conforme a figura 5). A medida da fluorescência é diretamente proporcional à quantidade de DNA produzido, pois o fluorómetro atua somente quando ligado à cadeia dupla, sendo esta uma ligação seletiva. A partir do patamar inferior da curva em que a fluorescência é detetada, assume-se no eixo das abcissas o número de ciclos  $C_t$ . Este valor corresponde à quantidade inicial de transcrito, refletindo em que medida o gene é expresso face ao controlo (Bio-Rad, 2006)



**Figura 3.1** A curva sigmoide apresenta o valor  $C_t$ , como medida utilizada para a quantificação da expressão génica. Adaptado de (Bio-Rad, 2006)

Com base na validação realizada em 3.2.3.2, a expressão relativa das diferentes enzimas antioxidantes do *P. penetrans* por contacto com o composto nematocida 3-octanol foi analisada por RT-qPCR. Para cada ensaio e respetivo tratamento (exemplo, ensaio ACE, tratamento dH<sub>2</sub>O) preparou-se um master *mix* para cada gene de interesse constituído por 10µL de solução NZYSupreme (NZYTech), 0,8µL de *primer reverse*, 0,8µL de *primer forward*, 1µL de cDNA e 7,4µL de água ultrapura para perfazer o volume de 20µL. Foram realizadas 2 réplicas técnicas para cada gene-tratamento-ensaio. No aparelho de real-time (BIOER), usando o programa 'PCR gene 9660', programou-se as seguintes condições de amplificação, nomeadamente desnaturação a 95°C durante 20s, emparelhamento em ciclos de 95°C durante 15s e 60°C durante 20s; e desenhou-se a distribuição das amostras numa placa de RT-qPCR (96 poços). A quantificação relativa é expressa pelo coeficiente de expressão normalizado  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak et al., 2001) em que:

$$\Delta CT(\text{teste}) = CT(\text{alvo, teste}) - CT(\text{ref, teste}) \text{ (1)}$$

$$\Delta CT(\text{calibrador}) = CT(\text{alvo, calibrador}) - CT(\text{ref, calibrador}) \text{ (2)}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{teste}) - \Delta CT(\text{calibrador}) \text{ (3)}$$

Os genes alvo e referência são, respectivamente, os genes de interesse (os enzimas antioxidantes) e a actina (Tabela 2). Relativamente às condições, a condição teste corresponde ao tratamento 3-octanol em ambos ensaios ACE e DMSO, e a condição calibrador corresponde aos tratamentos dH<sub>2</sub>O e ACE/DMSO em cada ensaio ACE e DMSO. O tratamento estatístico deu-se pela análise da variância ANOVA a um fator (Fisher) pressupondo a homogeneidade das variâncias à qual se obtiveram os valores F de 38,3, (ACE, g1=5, g2=6; 0,001 < p) e 22,1 (DSMO, g1=6, g2=7; 0,001 < p). Os valores de significância foram obtidos pelo teste Post-Hoc de Tukey. (jamovi 2.3.26) (ANEXO III; Tabela complementar II).

### 3.3 Equipamentos

- Balança OHAUS PIONEER
- Microcentrifuga; LaboGene
- Fluorómetro; Qubit 4
- Espectrómetro do tipo Nanodrop; Thermofisher 2000C
- Termo bloco Eppendorf
- Termociclador BIORAD T100
- Placa gelada; Strata coller
- Centrifuga de placas RT-qPCR
- Termociclador RT-qPCR; BIOER quant gene 9600
- Máquina fotográfica Canon Power shot g10; 14,7 mP
- Transiluminador VWR Geno view
- Tina 100mL; RAD Biorad-wide mini sub cell GT
- Fonte de alimentação Power Source da marca VWR, modelo 300V
- Vortex da marca VWR international, modelo 444-1372
- Centrifuga da marca Scanspeed, modelo mini

### 3.4 Reagentes

- Agarose (NYZtech)  
Greensafe (NYZtech)
- Marcador 1kb (BIORON)
- Supreme NYZ taq II DNA polimerase (Nzytech)
- qPCR NZYSupreme qPCR Green Master Mix (2x2) (Nzytech)
- Reagente (fluorómetro) Qubit; 1X dsDNA HS Assay kit
- Primers (Stabvida)
- Kit de extração de DNA: pep Gold Blood & tissue DNA mini kit e NYZ tech tissue gDNA isolation kit
- Kit de extração de RNA, RNeasy Mini Kit (QIAGEN);
- SuperScript III *First strand synthesis system* for RT-PCR (Invitrogen Thermo Scientific)
- MiniElute PCR purification kit (Qiagen)
- ExoSAP-IT (Thermo Fisher)

### 3.5 Diagrama do trabalho

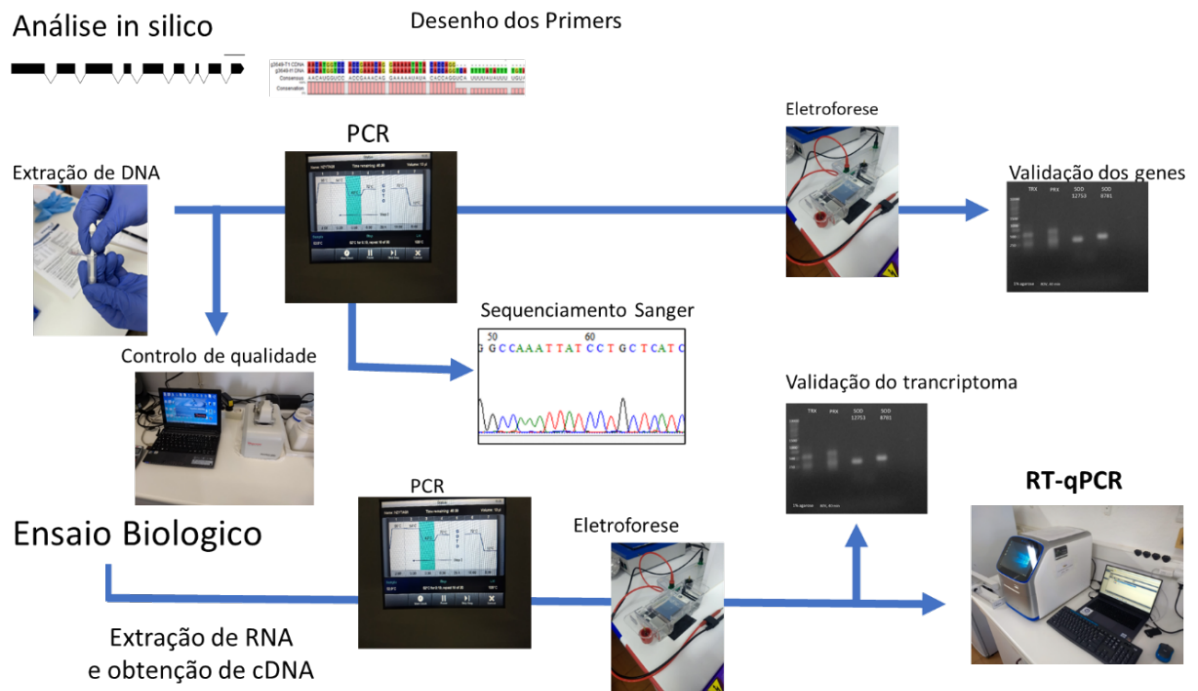


Figura 3.2 – Diagrama do trabalho.



## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Análise *in silico* das sequências preditas dos enzimas antioxidantes de *Pratylenchus penetrans*

Para o presente estudo foram selecionados os enzimas envolvidos na resposta ao stress oxidativo, nomeadamente peroxirredoxina PRX g18176, catalase (CTL, g7050 e g11092), superóxido dismutase (SOD, g8781, g8933 e g12753), glutathiona peroxidase GPX g3649, e tioredoxina Trx g19833 (Figura 3). As Tabelas 4 e 5 resumem as análises *in silico* das sequências preditas de DNA, cDNA e aminoácidos do genoma e transcriptoma do *P. penetrans*.

As PRXs são uma grande família de enzimas que mantêm um alto grau de conservação (Hewitt and Degman, 2023). Em comum têm um resíduo de cistina peroxidativa, que reduz hidroxiperoxidos e ácido peroxinitroso dos substratos, pelo que essencialmente o tiolato oxida-se a ácido sulfónico. Dependendo do substrato pode resultar em diferentes produtos como por exemplo água a partir do peróxido. A partir daí o enzima pode ser mais oxidado, inativando-se ou pode, de acordo com o mecanismo específico, mudar de conformação (Lang et al, 2023). O mecanismo típico 2-cis PRX envolve a ligação dissulfato num homodímero, o atípico 2-cis PRX numa ligação intramolecular ou 1-cis PRX por reduções sucessivas, uma no tiol, outra no dissulfato e por último um terceiro agente (Lang et al, 2023). O gene g18176, codificante do enzima PRX, apresenta um tamanho total de 916pb (pares de bases) para a sequência genómica e de 597pb para a sequência codificante, correspondendo à presença de 5 exões e 4 intrões. Por comparação com as bases de dados apenas a sequência cDNA apresenta correspondência, com a peroxirredoxina do nemátode *Globodera rostochiensis* (AHW98771.1) apresentando similaridade 80,81% com um e-value de  $1e^{-115}$ . A proteína predita deste gene apresenta um tamanho de 198 aa, e uma similaridade de 77,4% no nemátode *Globodera rostochiensis* (PRJNA695196) com um e-value  $1e^{-109}$ . A massa e ponto isoelétrico previstos são respetivamente 22,306 KDa e 5,24. Presente ao gene g18176, estão a subfamília Ahp/TSA (IPR045020), relacionada com a resposta ao stress oxidativo (GO:0006979), domínio tioredoxina (IPR013766), domínio subunidade C da hidroxiperoxido alquilo redutase e antioxidante específico do tiol (IPR000866), relacionado com as atividades antioxidantes (GO:0016209) e oxirredutase (GO:0016491) e domínio Terminal C da Peroxiredoxina (IPR019479), relacionado com a atividade da peroxiredoxina (GO:0051920).

As catalases (CTL) são enzimas antioxidantes comuns entre os organismos aeróbios, normalmente contendo o grupo heme inserido numa estrutura barril-beta. (Maté et al, 1999). A reação da catalase consiste na quebra de dois peróxidos de hidrogénio em duas de água e uma de oxigénio. No seu mecanismo de reação, a

porfirina ( $\text{Fe}^{3+}$ ) liga-se a um peróxido, oxidando-se para  $\text{Fe}^{4+}$  e gerando uma molécula de água. Depois o oxigénio ligado covalentemente ao ferro porfirínico liga-se a uma segunda molécula de peróxido, reduzindo-se para  $\text{Fe}^{3+}$ , levando à formação da segunda molécula de água, uma de oxigénio e a libertação do enzima (Maté et al, 1999). Os genes que codificam as catalases (g7050 e g11092) apresentam, respetivamente, um tamanho predito para a sequência genómica de 1654pb e 2345pb (DNA), e 1524pb, para as sequências codificantes (cDNA), justificado pela presença de 7 e 2 intrões, respetivamente. As sequências de cDNA das CTLs apresentaram correspondência com as catalases do nemátode *Meloidogyne enterolobii* (CAD2182800.1) com um *e-value* de 0 e similaridade de 95%. A proteína predita do g7050 apresenta um tamanho predito de 507 aa e similaridade de 80,3% no nemátode *Meloidogyne enterolobii* (A0A6V7W6Y3.1) com *e-value* de  $1,6e^{-109}$ . A massa prevista e ponto isoelétrico são 58,239 KDa e 8,12 respetivamente. A proteína codificada pelo g11092 apresenta um tamanho predito de 507 aa e similaridade de 55,1% no nemátode *Bursaphelenchus okinawaensis* (A0A811K7F2.1) com um *e-value* de  $1,1e^{-72}$ . A massa prevista e o ponto isoelétrico são 23,93 KDa e 5,78 respetivamente. Presente ao gene g7050 estão a família tipo, catalase monofuncional contendo o grupo heme (IPR018028), relacionada ao processo de resposta ao stress oxidativo (GO:0006979), função de atividade catalase (GO:0004096), função de ligante do grupo heme (GO:0020037) e o domínio relacionado com a assinatura de centro ativo proximal (PS51402). Ao gene g11092 estão presentes o já referido domínio PS51402 e domínio catalase PF00199, relacionado com funções moleculares de atividade catalase (GO:0004096) e de ligando heme (GO:0020037).

As SODs estão envolvidas na transformação do anião superóxido pela conversão a peróxido e oxigénio. Os seus iões ligantes, dependendo da sua forma, são  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^+$ , e  $\text{Mn}^{2+}$ . Podem ser encontradas na mitocôndria, citoplasma e no espaço extracelular (Zhao et al, 2021). A sua ação começa pela redução dos iões ligantes já referidos, pelo superóxido e formação de oxigénio. Na troca de cargas, está envolvido um protão, redutor, que permanece ligado depois da libertação do oxigénio. Depois os grupos ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) tornam a ligar-se a um segundo superóxido formando ligação entre protões, libertando peróxido e reoxidando o enzima. (Zhao et al, 2021). Relativamente aos genes que codificam as SOD (g8781, g8933 e g12753), apresentaram, respetivamente, um tamanho total de 646pb (presença de 2 intrões), 966 pb (presença de 3 intrões) e 1002pb (presença de 3 intrões) para a sequência de DNA e 546pb, 894pb, e 483pb para a sequência de DNA codificante. Por comparação com a base de dados, apenas as sequências de DNA codificante apresentaram correspondência, sendo o gene g8781 mais próximo a uma SOD de *Meloidogyne*

*graminicola* (KAF7638414.1) (e-value de  $1e^{-96}$ ; 79,9% de identidade), o gene g8933 com uma SOD de *Radopholus similis* (ANW72267.1) (e-value de  $6e^{-35}$  e 47,95% de identidade), e o gene g12753 com a SOD do nemátode *Meloidogyne graminicola* (KAF7637737.1) (e-value de  $1.e^{-62}$  e de identidade de 71,22%). A proteína codificada pelo g8781 com tamanho predito 181 aa apresenta similaridade de 81,3% no nemátode *Meloidogyne enterolobii* (A0A6V7Y3A0) com um e-value de  $9,9e^{-83}$ . A massa prevista e ponto isoelétrico são 20,32 KDa e 8,63 respectivamente. Os domínios funcionais presentes ao gene g8781 são (IPR019831) e (IPR019832), respetivos C e N terminais da família superóxido dismutase Mn/Fe, o “alpha hairpin domain” (PF00081), que estão todos relacionados com as funções de processo metabólico superóxido (GO:0006801) atividade metabólica superóxido dismutase (GO:0004784) e de metal de ião ligante (GO:0046872). Ao gene 8993 está presente o já referido o “alpha hairpin domain” (PF00081). Ao gene g12753, estão presentes a “assinatura 1” da superóxido dismutase Cu/Zn (Padrão) (PS00087), local ativo do aldeído desidrogenase (PS00687) e domínio de ligação Cu/Zn da superóxido dismutase (IPR001424) relacionado com o processo metabólico superóxido dismutase (GO:0006801) e ligando de ião metálico (GO:0046872). A SOD g8933 com tamanho predito 181 aa apresenta similaridade 79,4% no nemátode *Meloidogyne graminicola* (A0A8S9ZXF3) com um e-value  $5,7e^{-97}$ . A massa prevista e ponto isoelétrico são 20,325KDa e 8,63 respectivamente. A SOD g12753 com tamanho predito 260 aa, apresenta similaridade de 78% no nemátode *Meloidogyne graminicola* (A0A8S9ZLI6) com um e-value de  $5,7e^{-140}$ . A massa prevista e ponto isoelétrico são 29,8317KDa e 6,26 respectivamente. Existem várias glutations peroxidases (GPX) com formas distintas de funcionamento. As CisGPX contêm duas cisteínas uma peroxidativa e outra contida numa hélice flexível. As duas formam uma ligação dissulfato interna na redução dos substratos, designadamente em locais da proteína com configuração CXXC. Também existem GPX selénica, com o seu próprio ciclo catalítico (Brigelius-Flohé and Flohé., 2020). A forma ( $Se^{-1}$ ) da cisteína selénica adquire o grupo hidroxilo ao peróxido R-OOH. A cisteína (Se-OH) é então reduzida pela glutatona com um grupo tiol (GSH) e liberta-se  $H_2O$ . A este ponto o intermediário formado (Se-SG) retoma à forma ( $Se^{-1}$ ) pela sua redução por um segundo (GSH) e formação de (GSSG) (Pei et al, 2023). Uma das GPXs do *P. penetrans* é codificada pelo gene g3649 e apresenta o tamanho total de 966pb (presença de 7 intrões) para a sequência de DNA e 804pb para a sequência de cDNA. Esta GPX apresentou maior similaridade com o nemátode *Meloidogyne graminicola* (similaridade 78,21% com e-value de  $7e^{-144}$ ). A proteína predita de 260 aa apresentou 78% de similaridade no nemátode *Meloidogyne graminicola* (A0A8S9ZLI6) com um e-value de  $5,7e^{-140}$ . A massa

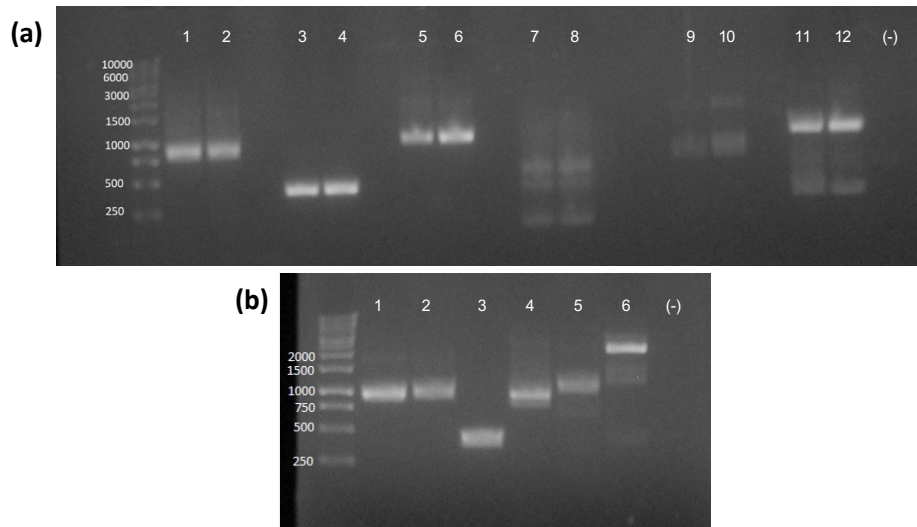
prevista e ponto isoelétrico são 29,8 kDa e 6,26 respectivamente. Presente ao gene g3649 está o domínio GLUTATHIONE\_PEROXID\_3 associado a (PS51355) (PS00460) (PS00763) e a família tipo, glutathione peroxidase (IPR000889) relacionada com a resposta ao stress oxidativo (GO:0006979) e atividade glutathione peroxidase (GO:0004602).

O ciclo catalítico da tiorredoxina TRX está relacionado com a TRX redutase, uma enzima selénica que utiliza o NADPH fornecido pela via das pentoses fosfato na redução da TRX (Muri et al, 2023). A sua forma reduzida é regulada por ligação intermolecular a uma proteína que bloqueia o seu funcionamento. Assim, no seu estado reduzido a TRX é capaz de fornecer prótons a proteínas oxidadas, participando na manutenção dos enzimas das vias antioxidantes (Muri et al, 2023). O seu local ativo de configuração (C-XX-C) constituído por dois resíduos cisteína, um nucleófilo e outro blindado interagem com o substrato proteico (Muri et al, 2023). Primeiramente dá-se o ataque ao dissulfeto da proteína pela cisteína nucleofílica, que resulta num estado transiente de ligação entre a TRX e o dissulfeto alvo. O passo seguinte é a formação da ligação do dissulfeto intramolecular, provocada pelo ataque da cistina blindada, o que reduz o substrato pela formação de tióis (Sousa et al., 2019). A TRX codificada pelo gene g19833 apresenta uma sequência de DNA de 885pb (presença de 5 exões e 4 intrões) e de cDNA de 672pb, apresentou similaridade (74,50%, e-value de  $4 \cdot e^{-77}$ ) com a TRX de *Meloidogyne graminicola* (KAF7636035.1). Em comparação à cadeia TRXg19833-t1 com tamanho predito 223aa, o gene mais próximo apresentou 74,5% de similaridade no nemátode *Meloidogyne graminicola* (A0A8S9ZRE5) com um e-value de  $1,9e^{-76}$ . A massa prevista e ponto isoelétrico são 25,5620kDa e 7,64 respectivamente. Presente ao gene g19833, está o domínio tiorredoxina (IPR013766) (PS51352) relacionado com a homeostasia redox da célula (GO:0045454) e domínio de dobra tipo da tiorredoxina (IPR012336).

#### 4.2 Validação dos genes que codificam enzimas antioxidantes de *Pratylenchus penetrans*

Vieira et al. (2015) apresentou, pela primeira vez, o transcriptoma do *P. penetrans*. O reconhecimento da infecção pelos mecanismos de defesa da planta leva à rápida libertação de ROS, o que implica a necessidade do *P. penetrans* produzir enzimas antioxidantes para a sua sobrevivência. Para validação dos genes que codificam os diferentes enzimas antioxidantes preditos a partir do genoma e transcriptoma de *P. penetrans* foi realizada amplificação dos mesmos a partir do DNA total extraído (Anexo I, tabela suplementar I). Podemos observar nas Figuras 5a e 5b as respetivas amplificações. À exceção do gene g8933 (SOD) e do gene g7050 (CTL), foi obtida uma banda única para os restantes genes com tamanho parcial ou aproximado

do tamanho predito pela análise *in silico* (Tabela 4). Este resultado poderá estar relacionado com a existência de uma família de genes para cada enzima antioxidante, dificultando assim a amplificação específica de cada gene.



**Figura 4.1** - Amplificação dos genes que codificam os enzimas antioxidantes a partir de DNA. Na figura A estão representados: 1-2, SOD(g12753); 3-4, SOD(g8781); 5-6 TRX(g19833); 7-8, SOD(g8933); (9-10, GPX(g3649); 11-12, PRX (g18176); e (-), controlo negativo. Na figura B estão representados: 1, PRX(g18176); 2, TRX(g19833); 3, SOD(g8781); 4, SOD(g12753), 5, GPX(g3649), 6, CTL(g11092) e (-), controlo negativo.

—

**Tabela 4.1** - Análise in silico dos genes que codificam as enzimas antioxidantes do *Pratylenchus penetrans*.

ENZIMA	GENE ID	DNA (PB)	CDNA(PB)	BLASTX (E-VALUE; %IDENTIDADE)	ESTRUTURA EXÃO/INTRÃO	PROTEÍNA (AA)	MASSA (KDA)	PONTO ISOELÉTRICO E SINAL PEPTÍDICO	UNIPROT (E-VALUE %IDENTIDADE)
PRX	g18176	916	597	<i>Globodera rostochiensis</i> AHW98771.1 (1e-115; 80,81%)		199	22,31	5,74 sem sinalP	<i>Meloidogyne graminicola</i> A0A8S9ZWF4 (77,4%; 1,6e-109)
CTL	g7050	2345	1524	<i>Meloidogyne enterolobii</i> CAD2182800.1 (e-value 0; 95%)		507	58,24	Com SinalP	<i>Meloidogyne enterolobii</i> A0A6V7W6Y3 (80,3%; 0)
	g11092	1654	1524	(e-value 0; 95%)		507	23,93	5,78 Sem sinalP	<i>Bursaphelenchus okinawaensis</i> A0A811K7F2 (55,1%; 1,1e-72)
SOD	g8781	646	546	<i>Meloidogyne graminicola</i> KAF7638414.1 (1e-96; 79,9%)		181	20,33	8,63 Sem sinalP	<i>Meloidogyne enterolobii</i> A0A6V7Y3A0 (81,3%; 9,9e-94)
	g8933	966	804	<i>Radopholus similis</i> ANW72267.1 (47,95%; 6e-35)		181	20,33	8,63 Sem sinalP	<i>Meloidogyne graminicola</i> A0A8S9ZXF3 (79,4%; 5,7E-97)
	g12753	1002	483	<i>Globodera pallida</i> KAI3419652.1 (6e-66; 72,14%)		160	17,17	6,78 Sem sinalP	<i>Meloidogyne graminicola</i> A0A8S9ZWP7 (71,2%; 1,8e-65)
GPX	g3649	966	804	<i>Meloidogyne enterolobii</i> CAD2156688.1 (78,21%; 7e-144)		260	29,83	6,26 Sem sinalP	<i>Meloidogyne graminicola</i> A0A8S9ZLI6 (78%; 5,7e-140)
TRX	g19833	885	672	<i>Meloidogyne graminicola</i> KAF7636035.1 (4e-77; 74,50%)		223	25,56	7,64 Sem sinalP	<i>Meloidogyne graminicola</i> A0A8S9ZRE5 (74,5; 1,9e-76)

PB, pares de bases; AA, aminoácidos; KDA, kilodalton

**Tabela 4.2 - Análise in silico das enzimas antioxidantes do *Pratylenchus penetrans*.**

ENZIMA	GENE ID	CLASSIFICAÇÃO INTERPRO		REAÇÃO ENZIMÁTICA
		FAMILIA E DOMINIO	GENE ONTOLOGY (GO)	NOMENCLATURA EC
PRX	g18176	IPR045020: Peroxiredoxina do tipo 1-Cis	Resposta ao Stress oxidativo (GO:0006979)	1-Cis peroxiredoxina (IPR045020): [prot]-ditiol + ROOH = [prot]-disulfito + H2O + ROH
		IPR013766: Dominio Tioeredoxina		
		IPR000866: Subunidade C da hidroxiperoxido alquilo redutase e antioxidante específico do tiol	Actividade oxidoreductase (GO:0016491) Actividade antioxidante (GO:0016209)	
		IPR019479: Peroxiredoxin_C Terminal C da Peroxiredoxina	Actividade peroxiredoxina (GO:0051920)	
CTL	g7050	IPR018028 Catalase monofuncional contendo heme	Resposta ao stress oxidativo (GO:0006979)	2H2O2 = 2H2O + O2
		IPR011614 superfamília Catalase PS51402 Assinatura de centro ativo proximal (PADRÃO)	Atividade catalase (GO:0004096) Ligante do grupo heme (GO:0020037)	
	g11092	PS51402 Assinatura de centro ativo proximal (PADRÃO)	Atividade Catalase (GO:0004096)	
		IPR011614 Dominio central da catase	Ligando heme (GO:0020037)	
SOD	g8781	IPR019831 Dominio terminal N da superóxido dismutase Mn/Fe	Processo metabólico superóxido (GO:0006801)	2 superóxido + 2 H+ = O2 + H2O2
		PF00081 dominio "alpha-hairpin domain"		
	IPR019832 Terminal C da familia superóxido dismutase Mn/Fe	atividade metabólica superóxido dismutase (GO:0004784) ião ligante de metal (GO:0046872)		
	g8933	PF00081 Dominio "alpha-hairpin"		

	g12753	PS00087 Assinatura 1 da superóxido dismutase Cu/Zn (Padrão) PS00687 Local ativo da aldeído desidrogenase IPR001424 Dominio de ligação Cu/Zn da superóxido dismutase	Processo metabolico superoxido dimutase (GO:0006801) Ligante ião metalico (GO:0046872)	
GPX	g3649	PS51355 Perfil da glutaciona peroxidase PS00460 centro ativo da Glutaiona peroxidase PS00763 Assinatura das Glutacionas peroxidases IPR000889	Resposta ao stress oxidativo (GO:0006979) Atividade Glutaciona peroxidase (GO:0004602)	2 glutaciona + H2O2 = glutaciona oxidada + 2 H2O
TRX	g19833	IPR013766 Dominio tiorredoxina IPR012336 Dobra tipo (Tiorredoxina) PS51352 Perfil de domínio Tiorredoxina	Atividade dissulfato isomerase de proteina (GO:0003756) GO:0045454; homeostase redox da célula	TRX-(SH)2 + [Proteina-S2] = TRX-S2 + [Proteina-(SH)2]



Posteriormente, foi feita a sequenciação de cada gene e comparado com as sequências inicialmente preditas (Anexo II). As sequências dos genes CTL (g11092) e SOD (g12753) apresentaram 100% de similaridade com a sequência inicialmente predita a partir do genoma do *P. penetrans*. Nas restantes sequências a % de similaridade variou entre 44,44% e 91,84%.

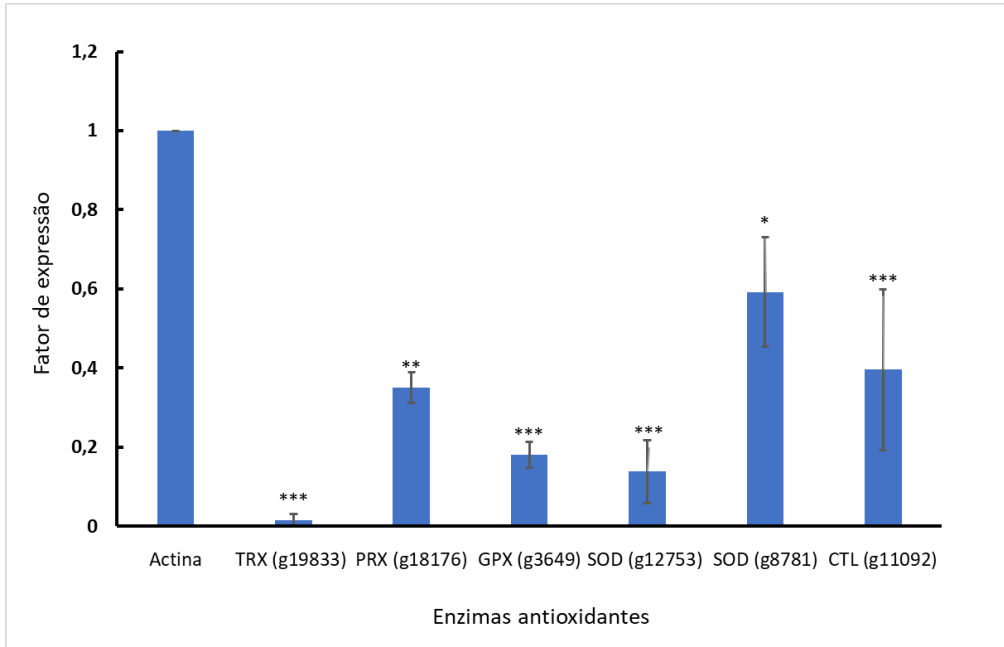
#### 4.3 Efeito do composto 3-octanol na expressão relativa dos enzimas antioxidantes de *Pratylenchus penetrans*

O modo de ação dos principais nematocidas utilizados no controlo dos nemátodes fitoparasitas tem sido estudado recentemente para o desenvolvimento de estratégias de gestão eficazes (Wram et al., 2022a; Wram et al., 2022b). Neste sentido, os produtos Fluensulfone, Fluopyram, Fluazaindolizine e oxamyl foram aplicados em juvenis de *Meloidogyne incógnita* durante 24h (Wram et al., 2019) e foi testada a expressão de genes a larga escala por RT-qPCR. Os genes estudados pertencem às vias de destoxificação xenobiótica e das proteínas de ligação do ácido retinóico (FAR). As FAR são proteínas exclusivas do filo *nematoda* ricas em helice- $\alpha$  e com alta afinidade a ácidos gordos, retinol e ácido retinoico. Foram lhes associadas as funções de sequestro, transporte e metabolismo de moléculas lipofílicas, regulação genica, entre outras (Barletta et al., 2019). Os vermes parasitas como os nemátodes possuem um metabolismo lipídico dependente da aquisição de lípidos a partir do hospede. Como tal, as FAR foram associadas a esta funcionalidade específica do parasitismo. (Barletta et al., 2021) (Vieira et al., 2017). Também foram estudados os genes que demonstraram uniformidade na forma como se alteraram na sua expressão ao longo dos ensaios independentemente dos tratamentos aplicados. Num estudo similar, os mesmos autores estudaram a expressão relativa de genes das vias associadas à oxidação de ácidos gordos, ciclo do ácido cítrico, glioxilato, fosforilação oxidativa e acetilcolina (Wram et al., 2022b). Sumarizando, com o modo de ação do oxamyl e fluopyram já conhecido, tentaram-se conhecer padrões de ação dos compostos. No geral, genes de enzimas pertencentes à via da beta-oxidação foram inibidos, com a exceção dos da CoA desidrogenase, ativados com fluopyram, Fluazaindolizine e oxamyl. Os enzimas pertencentes à via do ácido cítrico foram no geral inibidas pelos tratamentos com fluensulfone e fluazaindolizine salvo a 2-Oxaglutarado desidrogenase no tratamento por fluazaindolizine e a suncinato desidrogenase pelo tratamento com fluensulfone, ambas ativadas. Os tratamentos de fluopyram e oxamyl apresentaram pouca alteração da expressão dos enzimas à exceção da ativação da isocitrato desidrogenase pelo tratamento com oxamyl (Wram et al., 2022b), sendo que o fluopyram foi o que expressou menos alteração, com apenas 4 das 12 enzimas a sofrer alteração (Wram et al., 2022b).

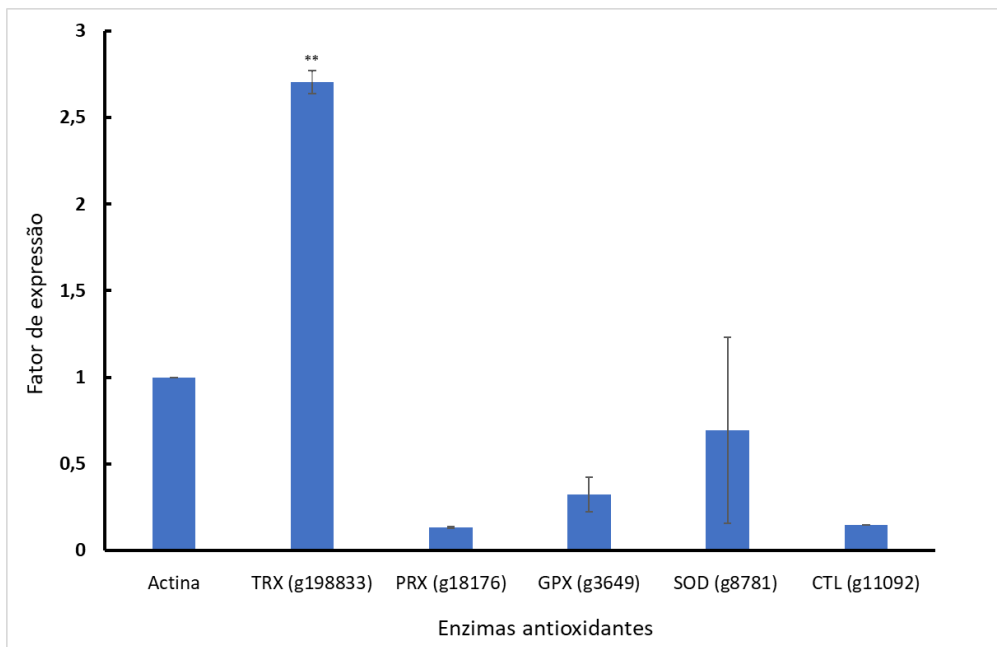
Na via glioxilato, associada à do ácido cítrico (Perry et al, 2013) houve a ativação da isocitrato liase no tratamento com oxamyl e os restantes tratamentos provocaram inibição. A via da fosforilação oxidativa foi alterada de forma diferente em cada tratamento. O enzima, acetilcolinesterase, recetor de acetilcolina e transportador de colina, da via dos neurónios acetilcolínicos, foi ativado pelo fluopyram, fluensulfone e fluazaindolizine. Houve uma inibição da ATPase tipo-V em todos os tratamentos. Os enzimas acetilcolinesterase e o recetor acetilcolina sofreram em média uma ativação (Wram et al., 2022b).

Em *P. penetrans*, é em grande parte desconhecido o efeito destes nematocidas. Contudo, Barbosa et al. (2022) demonstrou que os compostos catequina, ácido cafeico, ácido gálico e ácido gentísico são eficazes no controlo deste parasita. Com base neste estudo, avaliou-se o modo de ação do composto 3-octanol em *P. penetrans* foram realizados 2 ensaios independentes com diferentes solventes (ACE e DMSO). Cada ensaio continha 3 tratamentos, nomeadamente, tratamento com dH<sub>2</sub>O, tratamento com o solvente (ACE ou DMSO) e tratamento do 3-octanol dissolvido no solvente correspondente (ACE ou DMSO). Os resultados referentes a cada ensaio estão apresentados nos Gráficos 1 e 2. Como podemos verificar, em ambos os ensaios (ACE e DMSO), os genes que codificam as enzimas antioxidantes sofreram uma inibição na sua expressão quando comparados relativamente às condições padrão (dH<sub>2</sub>O) e à expressão do gene ACT. De referir que não foi obtida qualquer amplificação por RT-qPCR dos genes em estudo nos tratamentos com os solventes em ambos ensaios de ACE e DMSO, não podendo ser utilizados como condição padrão nestes ensaios. Neste sentido, os resultados obtidos são apenas referentes à condição padrão dH<sub>2</sub>O e à condição teste octanol. Em ambos os ensaios (Gráfico 1 e 2) verificou-se diferenças significativas entre os 2 tratamentos efetuados (ANEXO III). A média aritmética dos valores de expressão génica, relativos à exposição por 3-octanol em solvente acetona foi de 0,8. Em particular apresentaram-se os níveis de expressão para a TRX g19833 (2,704), PRX g18178 (0,133), GPX g3649 (0,323), SOD g8781 (0,695) e CTL g11092 (0,147) (Gráfico 1). Em média o nível de expressão foi 0,28 nos ensaios com o solvente DMSO. Em particular apresentaram-se os níveis de expressão para a TRX g19833 (0,015), PRX g18178 (0,351), GPX g3649 (0,181), SODg12753 (0,138), SOD g8781 (0,592) e CTL g11092 (0,396) Gráfico 2. Com a utilização de ambos os solventes a expressão destes enzimas foi inibida, com a exceção da TRX no ensaio com acetona. De forma semelhante existem exceções em (Wram et al., 2022a; Wram et al., 2022b), onde se encontram ensaios RT-qPCR cujos valores de regulação génica são inversos à tendência do grupo, ao nível do tratamento, gene ou ambos. Neste caso, possivelmente estarão envolvidos fatores de transcrição como os FOXO Forkhead box,

class O, associados à transcrição de enzimas de reparação como a tioredoxina redutase e peroxidoredoxina (Krafczyk et al, 2022). Para determinar a origem da ativação de genes da tioredoxina neste contexto, é necessário a continuação do estudo.



**Gráfico 4.1** - Comparação da expressão relativa dos genes que codificam enzimas antioxidantes relativamente ao gene de referência actina (ACT) no ensaio de 3-octanol dissolvido em DMSO. Símbolos no topo das colunas indicam diferenças significativas, \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ .



**Gráfico 4.1** - Comparação da expressão relativa dos genes que codificam enzimas antioxidantes relativamente ao gene de referência actina (ACT) no ensaio de 3-octanol dissolvido em ACE. Símbolos no topo das colunas indicam diferenças significativas, \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ .

## 5. Conclusões

O estudo do modo de ação dos compostos bioactivos utilizados no controlo dos nemátodes fitoparasitas, nomeadamente compostos nematodocidas, é importante para o desenvolvimento de estratégias de gestão eficazes destes parasitas. Neste trabalho foi estudada as vias de defesa dos nemátodes, via antioxidante e detoxificação. Foram selecionados enzimas integrantes da via antioxidante, nomeadamente peroxirredoxina, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, catalase, e tioredoxina. Concluiu-se que o 3-octanol apresentou um efeito inibidor das enzimas antioxidantes responsáveis pela degradação dos ROS gerados pela ação do composto. Em futuros trabalhos serão estudadas mais enzimas da via de detoxificação como complemento à via antioxidante do *P. penetrans*.

Esta estratégia engloba-se no desenvolvimento de prática de controlos seletivos, dentro do organismo que por norma exigem menos recursos, causando menos efeitos colaterais para ecossistemas, para a saúde humana e salvaguardando as culturas agrícolas das pragas e doenças.

## 6. Referências Bibliográficas

- Akhtar, M., & Malik, A. (2000). Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review. *Bioresource Technology*, 74(1), 35-47.
- Albarqi, M. M., Stoltzfus, J. D., Pilgrim, A. A., Nolan, T. J., Wang, Z., Kliewer, S. A., ... & Lok, J. B. (2016). Regulation of life cycle checkpoints and developmental activation of infective larvae in *Strongyloides stercoralis* by dafachronic acid. *PLoS pathogens*, 12(1), e1005358.
- Avery L., Shtonda B.B. (2003) Food transport in the *C. elegans* pharynx. *Journal of Experimental Biology*, 206, 2441–2457.
- Bagnaresi, P., Sala, T., Irdani, T., Scotto, C., Lamontanara, A., Beretta, M., ... & Sabatini, E. (2013). *Solanum torvum* responses to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *BMC genomics*, 14(1), 1-21.
- Barbosa, P., Faria, J., Figueiredo, A. C., Mota, M., & Vicente, C. S. (2022). Control of the root lesion *Pratylenchus penetrans*-the effect of nematocidal activity of plant-derived compounds. *Revista de Ciências Agrárias*, 45(4), 649-652.
- Barletta, G. P., Franchini, G., Córscico, B., & Fernandez-Alberti, S. (2019). Fatty acid and retinol-binding protein: unusual protein conformational and cavity changes dictated by ligand fluctuations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 59(8), 3545-3555.
- Bell, C. A., Lilley, C. J., McCarthy, J., Atkinson, H. J., & Urwin, P. E. (2019). Plant-parasitic nematodes respond to root exudate signals with host-specific gene expression patterns. *PLoS pathogens*, 15(2), e1007503.
- Bin-Jumah, M. N., Nadeem, M. S., Gilani, S. J., Al-Abbasi, F. A., Ullah, I., Alzarea, S. I., et al. (2022). Genes and Longevity of Lifespan. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1499.
- Bio-Rad, L. (2006). Real-time PCR applications guide. *Hercules: Bio-Rad Laboratories Inc*, 41.
- Boutrot, F., & Zipfel, C. (2017). Function, discovery, and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad-spectrum disease resistance. *Annual review of phytopathology*, 55, 257-286.
- Brigelius-Flohé, R., & Flohé, L. (2020). Regulatory phenomena in the glutathione peroxidase superfamily. *Antioxidants & redox signaling*, 33(7), 498-516.
- Castillo, P. and Volvas, N. (2007) *Pratylenchus* (Nematoda: *Pratylenchidae*); Diagnosis, Biology, Pathogenicity and Management. *Nematology Monographs and Perspectives* 6. Leiden: Brill.

- Chetia, A., Gogoi, P., Roy, P., & Goswami, M. (2019). Antagonistic plants as a tool of nematode management. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 7, 113-116.
- Chin, S., Behm, C. A., & Mathesius, U. (2018). Functions of flavonoids in plant–nematode interactions. *Plants*, 7(4), 85.
- Chitwood, D. J. (2002). Phytochemical based strategies for nematode control. *Annual review of phytopathology*, 40(1), 221-249.
- Cui, J., Ren, B., Tong, Y., Dai, H., & Zhang, L. (2015). Synergistic combinations of antifungals and anti-virulence agents to fight against *Candida albicans*. *Virulence*, 6(4), 362-371.
- Dhakshinamoorthy, S., Mariama, K., Elsen, A., & De Waele, D. (2014). Phenols and lignin are involved in the defence response of banana (*Musa*) plants to *Radopholus similis* infection. *Nematology*, 16(5), 565-576.
- Dubreuil, G., Magliano, M., Deleury, E., Abad, P., & Rosso, M. N. (2007). Transcriptome analysis of root-knot nematode functions induced in the early stages of parasitism. *New Phytologist*, 176(2), 426-436.
- Dutta, T. K., Khan, M. R., & Phani, V. (2019). Plant-parasitic nematode management via biofumigation using *brassica* and non-*brassica* plants: Status and future prospects. *Current plant biology*, 17, 17-32.
- Faizi, S., Fayyaz, S., Bano, S., Iqbal, E. Y., Lubna, Siddiqi, H., et al., (2011). Isolation of nematicidal compounds from *Tagetes patula* L. yellow flowers: structure–activity relationship studies against cyst nematode *Heterodera zae* infective stage larvae. *J. Agric. Food Chem.* 59 (17), 9080–9093. doi: 10.1021/jf201611b
- Fielenbach N, Antebi A. 2008. *C. elegans* dauer formation and the molecular basis of plasticity. *Genes and Development* 22: 2149–2165.
- Gamalero, E., & Glick, B. R. (2020). The use of plant growth-promoting bacteria to prevent nematode damage to plants. *Biology*, 9(11), 381.
- Gillet, F. X., Bournaud, C., Antonino de Souza Júnior, J. D., & Grossi-de-Sa, M. F. (2017). Plant-parasitic nematodes: towards understanding molecular players in stress responses. *Annals of Botany*, 119(5), 775-789
- Gommers, F. J., and Bakker, J. (1988). Mode of action of alpha-terthienyl and related compounds may explain the suppressant effects of *Tagetes* species on populations of free living endoparasitic plant nematodes. *Bioact. Mol.* 7, 61–69.
- Gough, E. C., Owen, K. J., Zwart, R. S., & Thompson, J. P. (2020). A systematic review of the effects of arbuscular mycorrhizal fungi on root-lesion nematodes, *Pratylenchus spp.* *Frontiers in Plant Science*, 11, 923.
- Goverse A, Smant G. 2014. The activation and suppression of plant innate immunity by parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 52: 243–265.

- Grushko, D., Boocholez, H., Levine, A., & Cohen, E. (2021). Temporal requirements of SKN-1/NRF as a regulator of lifespan and proteostasis in *Caenorhabditis elegans*. *Plos one*, 16(7), e0243522.
- Hall, T. A. (1999, January). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98). [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000..
- Hamaguchi, T., Sato, K., Vicente, C. S., & Hasegawa, K. (2019). Nematicidal actions of the marigold exudate  $\alpha$ -terthienyl: oxidative stress-inducing compound penetrates nematode hypodermis. *Biology Open*, 8(4), bio038646.
- Holbein, J., Grundler, F. M., & Siddique, S. (2016). Plant basal resistance to nematodes: an update. *Journal of experimental botany*, 67(7), 2049-2061
- Hölscher, D., Dhakshinamoorthy, S., Alexandrov, T., Becker, M., Bretschneider, T., Buerkert, A., ... & Swennen, R. L. (2014). Phenalenone-type phytoalexins mediate resistance of banana plants (*Musa spp.*) to the burrowing nematode *Radopholus similis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), 105-110.
- Honda Y, Honda S. 1999. The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *The FASEB Journal* 13: 1385–1393.
- Huang, J. S., and Barker, K. R. (1991). Glyceollin I in soybean-cyst nematode interactions: spatial and temporal distribution in roots of resistant and susceptible soybeans. *Plant Physiol.* 96 (4), 1302–1307. doi: 10.1104/ pp.96.4.1302
- Jones J.T., Haegeman A., Danchin E.G.J., Gaur H.S., Helder J., Jones M.G.K., Kikuchi T., Manzanilla-Lopez 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, 946–961.
- Jones, M. G. K., & Fosu-Nyarko, J. (2014). Molecular biology of root lesion nematodes (*Pratylenchus spp.*) and their interaction with host plants. *Annals of applied biology*, 164(2), 163-181.
- Kadota, Y., Shirasu, K., & Zipfel, C. (2015). Regulation of the NADPH oxidase RBOHD during plant immunity. *Plant and Cell Physiology*, 56(8), 1472-1480.
- Kaplan, D. T., Keen, N. T., & Thomason, I. J. (1980). Association of glyceollin with the incompatible response of soybean roots to *Meloidogyne incognita*. *Physiological Plant Pathology*, 16(3), 309-318.
- Kushida, A., & Kondo, N. (2015). A simple method for the detection and discrimination of *Pratylenchus* and *Meloidogyne* species in nematode communities. *Nematological Research (Japanese Journal of Nematology)*, 45(2), 101-114.

- Larsen PL. 1993. Aging and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90: 8905–8909.
- Lee, Hyun-Ah, et al., "Current understandings of plant nonhost resistance." Molecular Plant-Microbe Interactions 30.1 (2017): 5-15.
- Lin, C., Xiao, J., Xi, Y., Zhang, X., Zhong, Q., Zheng, H., ... & Chen, Y. (2019). Rosmarinic acid improved antioxidant properties and healthspan via the IIS and MAPK pathways in *Caenorhabditis elegans*. *BioFactors*, 45(5), 774-787.
- Lozano-Torres, Jose L., et al., "Dual disease resistance mediated by the immune receptor Cf-2 in tomato requires a common virulence target of a fungus and a nematode." Proceedings of the National Academy of Sciences 109.25 (2012): 10119-10124.
- Manohar, Murli, et al., "Plant metabolism of nematode pheromones mediates plant-nematode interactions." Nature communications 11.1 (2020): 1-11.
- Maté, M. J., Zamocky, M., Nykyri, L. M., Herzog, C., Alzari, P. M., Betzel, C., ... & Fita, I. (1999). Structure of catalase-A from *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of molecular biology, 286(1), 135-149.
- Morsy, K., Fahmy, S., Mohamed, A., Ali, S., El-Garhy, M., & Shazly, M. (2019). Optimizing and evaluating the antihelminthic activity of the biocompatible zinc oxide nanoparticles against the ascaridid nematode, *Parascaris equorum* in vitro. Acta Parasitologica, 64(4), 873-886.
- Murphy CT, Hu PJ. 2013. Insulin/insulin-like growth factor signaling in *C. elegans*. In: The *C. elegans* Research Community, WormBook: 1–30. doi/10.1895/wormbook.1.127.1, <http://www.wormbook.org>.
- Ntalli, N. G., & Caboni, P. (2012). Botanical nematicides: a review. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(40), 9929-9940.
- Oka, Y. (2010). Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments—a review. *Applied Soil Ecology*, 44(2), 101-115.
- Reynolds, L. B., Potter, J. W., & Ball-Coelho, B. R. (2000). Crop rotation with *Tagetes* sp. is an alternative to chemical fumigation for control of root-lesion nematodes. *Agronomy Journal*, 92(5), 957-966.
- Rooney, H. "C , Van't Klooster, J W , van der Hoorn, R A , Joosten, M H , Jones, J D & de Wit, P J (2005). Cladosporium Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance." *Science* 308.5729: 1783-6.
- Sahu, P. K., Jayalakshmi, K., Tilgam, J., Gupta, A., Nagaraju, Y., Kumar, A., ... & Rajawat, M. V. S. (2022). ROS generated from biotic stress: Effects on plants and alleviation by endophytic microbes. *Frontiers in Plant Science*, 13.



- Sigrist, C. J., De Castro, E., Cerutti, L., Cucho, B. A., Hulo, N., Bridge, A., ... & Xenarios, I. (2013). New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic acids research*, 41(D1), D344-D347.
- Singh, S. K., Hodda, M., Ash, G. J., & Banks, N. C. (2013). Plant-parasitic nematodes as invasive species: characteristics, uncertainty and biosecurity implications. *Annals of Applied Biology*, 163(3), 323-350.
- Sousa, S. F., Neves, R. P., Waheed, S. O., Fernandes, P. A., & Ramos, M. J. (2019). Structural and mechanistic aspects of SS bonds in the thioredoxin-like family of proteins. *Biological chemistry*, 400(5), 575-587.
- Torres, M. A., Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant physiology*, 141(2), 373-378.
- Tyagi, S., Shah, A., Karthik, K., Rathinam, M., Rai, V., Chaudhary, N., & Sreevathsa, R. (2022). Reactive oxygen species in plants: An invincible fulcrum for biotic stress mitigation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-11.
- Ube, N., Harada, D., Katsuyama, Y., Osaki-Oka, K., Tonooka, T., Ueno, K., ... & Ishihara, A. (2019). Identification of phenylamide phytoalexins and characterization of inducible phenylamide metabolism in wheat. *Phytochemistry*, 167, 112098.
- Vanfleteren R, de Vreese A. 1995. The gerontogenes age-1 and daf-2 determine metabolic rate potential in aging *Caenorhabditis elegans*. *The FASEB Journal* 9: 1355–1361.
- Vicente CSL, Nemchinov LG, Mota M, Eisenback JD, Kamo K, Vieira P. Identification and characterization of the first pectin methylesterase gene discovered in the root lesion nematode *Pratylenchus penetrans*. *PLoS One*. 2019 Feb 22;14(2):e0212540. doi: 10.1371/journal.pone.0212540.
- Vicente, C., Inácio, M. L., Mota, M., & Vieira, P. (2021). Vida Rural. Vida Rural, O NEMÁTODE-DAS-LESÕES-RADICULARES-PRATYLENCHUS-PENETRANS, 78–82.
- Vieira, P., Kamo, K., & Eisenback, J. D. (2017). Characterization and silencing of the fatty acid-and retinol-binding Pp-far-1 gene in *Pratylenchus penetrans*. *Plant Pathology*, 66(7), 1214-1224.
- Vieira, P., Maier, T. R., Eves-van den Akker, S., Howe, D. K., Zasada, I., Baum, T. J., & Kamo, K. (2018). Identification of candidate effector genes of *Pratylenchus penetrans*. *Molecular Plant Pathology*, 19(8), 1887-1907.
- Vieira, P.; Eves-van den Akker, S.; Verma, R.; Wantoch, S.; Eisenback, J.D. e Kamo, K. (2015). The *Pratylenchus penetrans* transcriptome as a source for the development of alternative control strategies: mining for putative genes involved in parasitism and evaluation of in planta RNAi. *PLoS ONE*, 10:e0144674.

- Wang, K.-H., Hooks, C. R., and Ploeg, A. (2007). "Protecting crops from nematode pests: using marigold as an alternative to chemical nematicides," in *Plant Disease*; PD-35 (Honolulu: University of Hawaii).
- Wram, C. L., & Zasada, I. A. (2019). Short-term effects of sublethal doses of nematicides on *Meloidogyne incognita*. *Phytopathology*, 109(9), 1605-1613.
- Wram C. L., Hesse, C. N., & Zasada, I. A. (2022a). Transcriptional changes of biochemical pathways in *Meloidogyne incognita* in response to non-fumigant nematicides. *Scientific Reports* 12:9875.
- Wram, C. L., Hesse, C. N., & Zasada, I. A. (2022b). Transcriptional response of *Meloidogyne incognita* to non-fumigant nematicides. *Scientific Reports*, 12(1), 9814.
- Yu, M. H., Heijbroek, W., & Pakish, L. M. (1999). The sea beet source of resistance to multiple species of root-knot nematode. *Euphytica*, 108(3), 151-155.
- Zhang, Yinhua, et al., "The chitin synthase genes chs-1 and chs-2 are essential for *C. elegans* development and responsible for chitin deposition in the eggshell and pharynx, respectively." *Developmental biology* 285.2 (2005): 330-339.
- Zhao, H., Zhang, R., Yan, X., & Fan, K. (2021). Superoxide dismutase nanozymes: an emerging star for anti-oxidation. *Journal of Materials Chemistry B*, 9(35), 6939-6957.
- Zhou, L., Wang, J., Wang, K., Xu, J., Zhao, J., Shan, T., & Luo, C. (2012). Secondary metabolites with antinematodal activity from higher plants. *Studies in natural products Chemistry*, 37, 67-114.

# **ANEXOS**

## ANEXO I - Quantificação e qualidade do DNA total extraído

*Tabela suplementar 1 – Quantificação (ng/μL) e qualidade (A260/280, A260/230) do DNA total extraído do nematode *P.penetrans* pelos aparelhos NANODROP 2000 e QUBIT 4.*

IDENTIFICAÇÃO AMOSTRA DE DNA	QUBIT 4	NANODROP 2000		
	CONCENTRAÇÃO (ng/ul)	Concentração (ng/ul)	A260/280	A260/230
A	1,64	---	1,93	0,61
B	1,47	---		
C	---	11,7	1,98	0,64
D	---	4,8	1,71	0,64
E	---	8,3	1,95	0,60
F	---	1,7	5,24	0,43

## ANEXO II - Alinhamento de seqüências

PRXg18171

```
ATGAGCACCAACAGCAAAGCGCAAAATGGCAAACCTGCACCAGATTTCTCGGCTGATGCGGTGTGAAACGGCGGATTTCAAGAGAGTCTCAC 91
A-----GAGTGTCCAC 10
TGGGTGATTACAAGGGACAATATGTTGTACTATTTTCTATCCACTTGATTTGTAAGTTTAATTAGATCGAAGTCCTTTAAAAAATTAGTT 181
TGGGTGATTACAAGGGACAATATGTTGTGCTCTTTTCTATCCACTTGATTTGTAAGTTCAATTAGATCAAAGATCTTTAAAAAATTAGTT 101
CCATTTAAAGCACATTTGTTTGCCCAACCGAAATAATGCCTTCTCGGATCGTTCGGATGATTTTAAAGCAAGTCAATTCAGCTGCTGAC 272
CATTTAAAGCACATTTGTTTGCCCAACCGAAATAATGCCTTCTCGGATCGATCGGATGATTTTAAAGCAAGTCAATTCAGCTGCTGAC 191
CTGCTCAACGGACTCAAATTAAGTATTAAGTCAATTCATAAAGTCCACATAAAATTTATTCGGAATATATTCCTAAACATTAGCCA 363
CTGCTCAACGGACTCAAATTAAGTATTAAGTCAATTCATAAAGTCCACATAAAATTTATTCGGAATATATTCCTAAACATTAGCCA 282
TCTTGAATGGACTTTGAAGAAACATAAGTACGGCGGCTTGGCGAGATGAAGATCCCGATGCTGGCCGACACTAATCAGAAAAATCAGCCGC 454
TCTTGAATGGACTTTGAAGAAACATAAGTACGGCGGCTTGGCGAGATGAAGATCCCGATGCTGGCCGACACTAATCAGAAAAATCAGCCGC 373
GACTATGGAGTGCCTAAGGAGGAAGATGGCATCGCATTCGGTATTTTAAAAACCTTAATAACATAAAGTGGATAGTAATTTCTCAT 545
GACTATGGAGTGCCTAAGGAGGAAGATGGCATCGCATTCGGTATTTTAAAAACCTTACCTA-----AACTAGCTGGATAGTA----- 453
TATTTTAGTGGTCTGTTTATCATCGACGGCAAAGTATTCCTCCGCAAAATCACAATCAATGATCTCCGGTGGCCGCAATGTAGATAGG 636
----- 453
TTACTCTATAGTATTATTCACCAAAATCTAAGTACTAACAAGTGTAAATATAGAAATATAACCTAACAAGTAAAGTGGAGCAAAACAATTT 727
----- 453
AGGAAATATATGTAATTTATACCAAAAAATATAAATATTTAATTTTATACAATCAGACTCTCGTCTGGTGAAGCCCTTCCAATTTACTG 818
----- 453
ATGAACATGGCGAAGTTTGCCCAAGTCAATGGACACCGCGCGGACACAATCAACCGGATCCGGAAGAATAGCCAGGACTACTTCAACAA 909
----- 453
GCAATAA 916
----- 453
```

SODg8781

```
ATGTTAGCAGTGAAAAGGTTATTCATTCATTGAAACTAGAGTAGAATCATATATTTTTTGACAGTATTTTGAAGTACAATCCAACATCATC 91
A----- 1
ATTGACGAGAGCTCTAAAGCATGCTTACCAGATCTTCCATTTGACTACAATGCTTTGGAGCCGGTAAATCGCAACGGAAATTTATGCAAAATC 182
----- 1
CACCATCAAAAAGCATCACGCAACATATGTAACAATTTAAATATAGCCGAAGAGAAGACTCAGGAAGCACTTGCAAAAGGTCAGCTAACA 273
-----AGGTCAGCTAACA 15
AGATGCTTGT TTTGTTTATATT TTTTGTACATATAATAGGTGACATTCGCACAGCCATTC AATTACAGAGTGCATTTGAAATTC AATGGT 364
AGATGCTTGT TTTGTTTATATT TTTTGTACATATAATAGGTGACATTCGCACAGCCATTC AATTACAGAGTGCATTTGAAATTC AATGGT 106
GGAGGCCATATTAATCATTTATATCTGGACAAATTTATGCAAGGATGGTGGTGAACCTGATGGCCAACTTCTTCAGCAATCAAAAAGG 455
GGAGGCCATATTAATCATTTGATATCTGGACAAATTTATGCAAGGATGGTGGTGAACCTGATGGCCAACTTCTTCAGCAATCAAAAAGG 197
ATTTTGGATCAGTACAGGCCATGCAAGATAAATCAATGCCATGCTATTGCAATTC AAGGATCGGGTTGGGGATGGCTTGGCTATAATAA 546
ATTTTGGATCAGTACAGGCC----- 216
GAACGAAAAGCGATTGGAACCTTGCTGTTGTCCCAATCAAGACCCTTTAGAACCACAACAGGTCATAATTTTATGCAAAATTTTACAAA 637
----- 216
AAAATTTAG 646
----- 216
```

TRX g19833

```
ATGCCATCAAGTTCTACAAAATCTGACTCGATGCACCTCCCAATAAGCCGCCCATCAGCACATCCACAGCCAAGATATTCACCAACA 91
A----- 1
TTCGCAAGTTTCCAAACCCACGAAACATCACCATCAGTATCATCGATTTCTTGTGCGTGTGCAATGCTAAAAT AATCCATATTTTATCC 182
----- 1
TTTATGTTAAAAAAGATTGTCAAAATTCAGCAATCAATCCAACCAATTCACACGTCGAATTTGCACAATTCAGCAACAGCAGCACCAGC 273
----- 1
AAAAACAAAT AATAGAATGGCTCAACTACTTGCCGGACAACCAATTTGTGTGAATGATGGAACAACCGTGGATGCTGGCGACTATTTGAAGG 364
-----CTACTTGCCGGAAAACCAATTTGTGTGAAGATGGAACAACCGTGGATGCTGGCGACTATTTGAAGG 68
ACAAGGTTGTTGCCATTTT TTTCTCGGCCATGTTGGTCCCTCCGTCGCCGCGCATTCACCCCAAACCTTAAGGTATAACCGCC--AGAAAT 453
AAAAGGTTGTTGCCATTTT TTTCTCGGCCATGTTGGTCCCTCCGTCGCCGCGCATTCACCCCAAACCTTAAGGTATAACTACCCGCAAAAT 159
GTGGTTAATTA AATGATTTTTTAAATAGAAATTTACGAGGAATGGAAGGAGCGGGCAAAAATTTGCAAGTATCTTCTGCTCCAGGGA 544
GTGGTTAATTA AATGATTTTTTAA AAAAAATTTCAAGGAATGGAAGGAGCGGGCAAAAATTTT AAGTATCTTCTCTCC----- 245
CCGACGCGCGAGGACCTCAAGAGTACTACAATGATCACACCGGACGATGGTGTACATGAGTTTGGTGACCGGAAGATTGCGTGAGTT 635
----- 245
ATTATGCAGATCTTCCAGACAAAAAACCATTCTATTTTCAGTGAGCTCTCGAGAAATTTGCGCTCAAGACCATTCCAACCTTGCAGGCTG 726
----- 245
ATCAAGCCGGATGGGAGTGTGTGGTACAAGATGCGCGTACGGAAATTCAGGTTTTTTTTAAAACATAGTTAAATCTTTTACTTTCATAT 817
----- 245
TTGTGTAGGAGAAGGCCAAGAGAATGCACTGGAACCTTTGGGATGAATGGATGTCATCTACGAGTAA 885
----- 245
```

*Figura suplementar 1- Alinhamento de seqüências obtidas por sequenciação de Sanger. A primeira seqüência corresponde à seqüência predita, sendo a segunda seqüência a obtida por sequenciação. A cor-de-rosa encontram-se os nucleótidos não coincidentes, podendo isso ocorrer pela simples falta do nucleótido sequenciado que corresponda ao predito (-) ou por se tratarem de nucleótidos diferentes.*

## ANEXO III - Análise estatística

**Tabela suplementar 2** - Análise estatística dos ensaios de 3-octanol dissolvido em ACE e DMSO. Análise da variância ANOVA e teste Post HOC de Tukey. Determinação dos valores de expressão significativos (jamovi 2.3.26).

### ANOVA a um fator

ANOVA a um fator (Fisher)

	F	gl1	gl2	p
Octanol-Acetona	38.3	5	6	< .001

### Testes Post Hoc

Teste Post-Hoc de Tukey – Octanol-Acetona

		PRX	TRX	GPX	SOD 87	CTL	ACT
PRX	Diferença média	—	-2.57 ***	-0.190	-0.559	-0.0140	-0.867
	p-value	—	< .001	0.946	0.254	1.000	0.055
TRX	Diferença média		—	2.381 ***	2.011 ***	2.5570 ***	1.704 **
	p-value			—	< .001	< .001	0.002
GPX	Diferença média			—	-0.370	0.1755	-0.677
	p-value				—	0.597	0.141
SOD 87	Diferença média				—	0.5455	-0.307
	p-value					—	0.273
CTL	Diferença média					—	-0.853
	p-value						—
ACT	Diferença média						—
	p-value						—

Nota. \* p < .05, \*\* p < .01, \*\*\* p < .001

### ANOVA a um fator

ANOVA a um fator (Fisher)

	F	gl1	gl2	p
Octanol - DMSO	22.1	6	7	< .001

### Testes Post Hoc

Teste Post-Hoc de Tukey – Octanol - DMSO

		PRX	TRX	GPX	SOD 87	SOD12	CTL	ACT
PRX	Diferença média	—	0.336	0.170	-0.241	0.2130	-0.0440	-0.649 **
	p-value	—	0.102	0.633	0.314	0.425	0.999	0.004
TRX	Diferença média		—	-0.165	-0.577 **	-0.1230	-0.3800	-0.985 ***
	p-value			—	0.659	0.007	0.862	0.060
GPX	Diferença média			—	-0.411 *	0.0425	-0.2145	-0.820 ***
	p-value				—	0.042	0.999	0.418
SOD 87	Diferença média				—	0.4540 *	0.1970	-0.408 *
	p-value					—	0.026	0.499
SOD12	Diferença média					—	-0.2570	-0.862 ***
	p-value						—	0.261
CTL	Diferença média						—	-0.605 **
	p-value							—
ACT	Diferença média							—
	p-value							—

Nota. \* p < .05, \*\* p < .01, \*\*\* p < .001