



UNIVERSIDADE
DE ÉVORA

Departamento de Química e Bioquímica
Curso de Licenciatura em Bioquímica

Análise de expressão de genes do nemátode fitoparasita, *Bursaphelenchus xylophilus* em resposta ao composto benzaldeído

Relatório de estágio realizado por Sónia Portalegre

Orientador: Doutora Margarida Espada

Co-orientadores: Doutora Cláudia Vicente Letras, Mestre Madalena Mendonça

Évora
2024

“Este trabalho não inclui as observações do júri”



UNIVERSIDADE
DE ÉVORA

Departamento de Química e Bioquímica
Curso de Licenciatura em Bioquímica

Análise de expressão de genes do nemátode fitoparasita, *Bursaphelenchus xylophilus* em resposta ao composto benzaldeído

Relatório de estágio realizado por Sónia Portalegre

Orientador: Doutora Margarida Espada

Co-orientadores: Doutora Cláudia Vicente Letras, Mestre Madalena Mendonça

Évora

2024

“Este trabalho não inclui as observações do júri”

I - Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer às orientadoras Doutora Margarida Espada, Doutora Cláudia Vicente Letras e Mestre Madalena Mendonça por me receberem no Laboratório de Nematologia, com imensa simpatia e paciência. Estou grata pela disponibilidade e dedicação e pela oportunidade de aprendizagem transmitidas ao longo do estágio.

Quero agradecer à Universidade de Évora, à comissão de curso e docentes da licenciatura em Bioquímica pelo percurso académico enriquecedor, pelos conhecimentos e formação que desenvolvi ao longo da licenciatura. Um especial obrigado aos meus colegas Rita, Sara, Ruben e Afonso, que me acompanharam ao longo desta jornada.

Por fim quero agradecer à minha família, em especial aos meus pais, que sempre me apoiaram e encorajaram ao longo do meu percurso académico. Por todo o amor, carinho e compreensão que sempre demonstram.

II - Resumo

O setor florestal, que assume um papel essencial a nível económico no país, é fortemente afetado por pragas. A doença da murchidão do pinheiro, causada pelo nemátode da madeira do pinheiro (NMP), *Bursaphelenchus xylophilus*, é responsável por elevadas perdas económicas e ambientais a nível mundial. Em Portugal, o controlo desta doença é essencial de forma a minimizar os danos causados. Existem várias estratégias de controlo, sendo comum a utilização de tratamentos químicos que, apesar de alguma eficácia, apresentam toxicidade para os ecossistemas. Novas alternativas mais sustentáveis têm surgido para o controlo da doença, como a utilização dos óleos essenciais de plantas, que mostraram ter um efeito nematodocida mais eficaz. Um composto orgânico, benzaldeído (C₇H₆O), mostrou ter uma eficácia significativa na mortalidade do NMP. Neste sentido, pretende-se com este trabalho avaliar a expressão diferencial de genes no NMP em resposta à ação do composto benzaldeído (C₇H₆O), assim como, compreender quais as vias metabólicas associadas a essa resposta. No presente estudo, uma lista de 8 genes candidatos previamente identificados foram caracterizados e validados através da análise *in silico* e amplificação por PCR. A análise da expressão relativa dos genes em resposta ao benzaldeído mostrou que diferentes genes que codificam proteínas da via metabólica dos xenobióticos são altamente expressos quando comparados com o controlo.

Palavras-chave: Patologia vegetal; doença da murchidão do pinheiro; controlo; nematodocida.

III - Abstract

The forestry sector, which plays an essential economic role in the country, is heavily affected by variations in ecosystems due to the dispersal of pests. Pine wilt disease, caused by the pine wood nematode (PWN), *Bursaphelenchus xylophilus*, is responsible for significant economic and environmental losses worldwide. In Portugal, to control this disease is essential to minimize the damage caused by the parasitic nematode. Several control strategies are used, such as chemical treatments; however, despite some effectiveness, they pose toxicity risks to ecosystems. New and more sustainable alternatives have emerged for disease control, such as the use of plant essential oils, which have shown to have a more effective nematicidal effect. An organic compound, benzaldehyde (C₇H₆O), has shown significant PWN mortality. In this context, the aim of this work is to evaluate the differential gene expression in PWN in response to the action of benzaldehyde (C₇H₆O), as well as to understand the metabolic pathways associated with this response. In the present study, a list of 8 previously identified candidate genes were characterized and validated through in silico analysis and PCR amplification. The analysis of the relative expression of the genes in response to benzaldehyde showed that different genes encoding proteins from the xenobiotic metabolic pathway are highly expressed compared to the control.

Keywords: Plant pathology; pine wilt disease; control; nematicide.

ÍNDICE

I - AGRADECIMENTOS.....	I
II - RESUMO	II
III - ABSTRACT	III
IV - ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
V - ÍNDICE DE TABELAS.....	VI
VI - LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS	VII
1. PROBLEMÁTICA	1
2. OBJETIVOS DO TRABALHO	2
3. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	3
3.1 NEMÁTODES PARASITAS DE PLANTAS.....	3
3.2 - NEMÁTODE DA MADEIRA DO PINHEIRO, <i>BURSAPHELENCHUS XYLOPHILUS</i>	4
3.3 - CICLO DE VIDA DO NMP	6
3.4 - METODOLOGIAS DE CONTROLO DO NMP	7
3.4.1. <i>Moléculas com ação nematodocida derivados de plantas</i>	<i>7</i>
3.5 – INTERAÇÃO ENTRE NEMÁTODE E A PLANTA	8
3.5.1 <i>Proteínas de parasitismo dos NPP durante a infeção.....</i>	<i>8</i>
3.5.2. <i>Mecanismos de defesa das plantas contra os NPP.....</i>	<i>9</i>
4. METODOLOGIA	10
4.1. ESTRATÉGIA.....	10
4.1.1 <i>Técnicas utilizadas.....</i>	<i>10</i>
4.1.2 <i>Equipamentos</i>	<i>10</i>
4.1.3 <i>Reagentes.....</i>	<i>11</i>
4.2. CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS GENES COM EXPRESSÃO DIFERENCIAL EM RESPOSTA AO BENZALDEÍDO.....	11
4.2.1. <i>Análise in silico de genes candidatos de Bursaphelenchus xylophilus</i>	<i>11</i>
4.3. VALIDAÇÃO DOS GENES CANDIDATOS.....	12
4.3.1. <i>Extração e quantificação de DNA genómico</i>	<i>12</i>
4.3.2. <i>Desenho de primers para amplificação de genes candidatos por PCR.....</i>	<i>12</i>
4.3.3. <i>Amplificação de genes candidatos por PCR</i>	<i>13</i>
4.3.4. <i>Eletroforese em gel de agarose.....</i>	<i>14</i>
4.3.5. <i>Purificação, sequenciação de DNA e análise de sequências</i>	<i>14</i>
4.3.6. <i>Síntese de cDNA e amplificação de transcritos por RT-PCR.....</i>	<i>15</i>
4.4. ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO RELATIVA DOS GENES VALIDADOS POR QRT-PCR 16	16

4.4.1 Desenho de primers para qRT-PCR.....	16
4.4.2 Quantificação da expressão relativa dos genes candidatos por qRT-PCR (real time PCR).....	16
4.5. DIAGRAMA DO TRABALHO EXPERIMENTAL.....	18
5. RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÃO.....	19
5.1 CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS GENES COM EXPRESSÃO DIFERENCIAL EM RESPOSTA AO BENZALDEÍDO.....	19
5.2 VALIDAÇÃO DOS GENES CANDIDATOS.....	24
5.3 ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO RELATIVA DOS GENES VALIDADOS POR QRT-PCR	27
6. CONCLUSÕES.....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
ANEXOS.....	39
ANEXO A – ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS.....	40
ANEXO B – ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42

IV - Índice de Figuras

Figura 3.1 - Esquema da região anterior de uma nematode fitoparasita onde estão representados o estilete e as glândulas esofágicas (duas glândulas subventrais, subventral gland e uma glândula dorsal, dorsal gland) (adaptado de Hussey et al., 2002). **Error! Bookmark not defined.**

Figura 3.2 - Diferentes modos de parasitismo nos nemátodes fitoparasitas: endo e ectoparasitas migratórios e endoparasitas sedentários (adaptado de Topalovic and Vestergard, 2021) 4

Figura 3.3 - Sintomas da DMP em pinheiros-bravos do género *Pinus* com a copa murcha e acastanhada rodeados de pinheiros assintomáticos com a copa verde localizados em Portugal (adaptado de Vicente et al., 2021) (Cortesia: Prof Manuel Mota; autoestrada A6, Portugal) 5

Figura 3.4 - Observação microscópica do macho e da fêmea de *Bursaphelenchus xylophilus*. A- Espícula curva do macho (Cu); B- Vulva sobreposta da fêmea (VF) Escala: Barra= 10 µm (adaptado de Trindade, 2012); C- Observação microscópica de *B. xylophilus* juvenil microscópio Leica DMI com ampliação 200x (adaptado de Madalena Mendonça, Laboratório de Nematologia, Universidade de Évora)..... 5

Figura 3.5 - Ciclo de vida do nemátode do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*, e doença da murchidão do pinheiro (adaptado de Pires et al., 2022). 6

Figura 3.6 - Estrutura do benzaldeído (adaptado de Sigma-Aldrich)..... 8

Figura 3.7 - Esquema representativo da interação entre *Bursaphelenchus xylophilus* e as células da planta hospedeira (*Pinus* sp.), mediada por proteínas relacionadas com o parasitismo e (maioritariamente) expressas nas glândulas esofágicas (SVG e DG), que estão localizadas na região anterior do nemátode. Estas proteínas são secretadas para o interior das células do hospedeiro através do estilete (S). Diferentes proteínas envolvidas no parasitismo estão envolvidas na migração, alimentação e defesas do nemátode fitoparasita; outras proteínas que não se sabe qual a sua função (“novas proteínas”) e não têm similaridade com proteínas disponíveis nas bases de dados públicas (adaptado de Espada et al.2022). 9

Figura 4.8 - Representação gráfica de resultados de amplificação por qRT-PCR (Adaptado de Oliveira, 2010) 17

Figura 4.9 - Diagrama ilustrativo do trabalho experimental 18

Figura 5.10 - Esquema de ilustrativo exões e intrões para cada gene em estudo. 19

Figura 5.11 - Visualização por eletroforese em gel de agarose dos resultados da amplificação dos 8 genes candidatos por PCR. A- BXY_1091400; B- BXY_0066100; C- BXY_0119000; D- BXY_0675700; E- BXY_0628900; F- BXY_1351100; G- BXY_1655900; H- BXY_0386800; Controlo -: controlo negativo; Marcador: 1 kb DNA Ladder ready-to-use (BIORON). 25

Figura 5.12 - Alinhamento da sequência predita e obtidas pela sequenciação direta Sanger para o gene BXY_1351100 através do software Clustal W Multiple alignment v. 2.1. 26

Figura 5.13 - Visualização por eletroforese em gel de agarose dos resultados da amplificação dos transcritos dos genes candidatos por RT-PCR, nos três tratamentos em triplicado. E-

<i>BXY_0628900; F- BXY_1351100; G- BXY_1655900; H- BXY_0386800; Controlo -: controlo negativo; Marcador: 1 kb DNA Ladder ready-to-use (BIORON).</i>	27
Figura 5.14 - <i>Comparação da expressão relativa de cada gene entre as condições em estudo (controlo, DMSO e BZ). As diferenças significativas entre condições estão assinalados com os símbolos (*$p < 0,05$ **$p < 0,01$ ***$p < 0,001$).</i>	29
Figura suplementar A 15 - <i>Alinhamento entre as sequencias obtidas pela sequenciação direta de Sanger e as sequencias inicialmente preditas para o gene BXY_0386800. Através do software Clustal W Multiple alignment v. 2.1</i>	40

V - Índice de Tabelas

Tabela 5.1 - <i>Análise in silico dos genes, transcritos e proteínas codificantes em estudo.....</i>	20
Tabela 5.2 - <i>Lista de primers para cada gene candidato e respectivas sequências, temperatura de melting e annealing percentagem de GC e tempo de extensão, condições utilizadas na amplificação por PCR.....</i>	24
Tabela 5.3 - <i>Lista de primers e respectivas sequências, temperatura de melting e percentagem de GC para cada transcrito para amplificação qRT-PCR.....</i>	28
Tabela B.4 - <i>Análise de variância ANOVA para as três condições (controlo, DMSO e BZ) do gene BXY_0386800, pelo teste Post-Hoc de Tukey, através do software jamovi v.2.3.28.....</i>	42
Tabela B.5 - <i>Análise de variância ANOVA para as três condições (controlo, DMSO e BZ) do gene BXY_1351100, pelo teste Post-Hoc de Tukey, através do software jamovi v.2.3.28.....</i>	42
Tabela B.6 - <i>Análise de variância ANOVA para as três condições (controlo, DMSO e BZ) do gene BXY_1351100, pelo teste Post-Hoc de Tukey, através do software jamovi v.2.3.28.....</i>	42
Tabela B.7 - <i>Análise de variância ANOVA para as três condições (controlo, DMSO e BZ) do gene BXY_0628900, pelo teste Post-Hoc de Tukey, através do software jamovi v.2.3.28.....</i>	43
Tabela B.8 - <i>Análise de variância ANOVA para as três condições (controlo, DMSO e BZ) do gene BXY_1091400, pelo teste Post-Hoc de Tukey, através do software jamovi v.2.3.28.....</i>	43
Tabela B.9 - <i>Análise de variância ANOVA para as três condições (controlo, DMSO e BZ) do gene BXY_0119000, pelo teste Post-Hoc de Tukey, através do software jamovi v.2.3.28.....</i>	43
Tabela B.10 - <i>Análise de variância ANOVA para as três condições (controlo, DMSO e BZ) do gene BXY_1655900, pelo teste Post-Hoc de Tukey, através do software jamovi v.2.3.28.....</i>	44

VI - Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

BZ – Benzaldeído

cDNA - DNA complementar

CYP450 - Citocromo P450

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DMP - Doença da murchidão do pinheiro

DMSO - Sulfóxido de dimetilo

FMO - Flavina monoxigenase

GPCP - Recetores acoplados a proteína G

GST - Glutathione-S-transferase

GSH - Glutathione

NGS - Sequenciação de nova geração (do inglês, Next Generation Sequencing)

NMP - Nemátode da madeira do pinheiro

NPP - Nemátodes parasitas de plantas

OE - Óleos essenciais

OEPP - Organização Europeia para a Proteção de Plantas

PCR - Reação em cadeia de polimerase (do inglês, polymerase chain reaction)

PTI - Pattern-triggered immunity

qRT-PCR - PCR em tempo real com transcriptase reversa (quantitative reverse transcriptase PCR)

RT-PCR - Reação em cadeia de polimerase com transcriptase reversa

SRs - Recetores de serpentina

Trx - Tiorredoxina

TrxR - Tiorredoxina redutase

UE - União Europeia

UGT - UDP-glucuronosiltransferases

1. Problemática

Os nemátodes parasitas de plantas (NPP) ameaçam a sustentabilidade das culturas e produção agrícola e florestal ao nível mundial. O nemátode da madeira do pinheiro (NMP), *Bursaphelenchus xylophilus*, é um dos dez NPPs com maior impacto económico e importância científica ([Jones et al., 2013](#)). Este endoparasita é responsável pela doença da murchidão do pinheiro (DMP), que causa a murchidão e morte de várias espécies de coníferas, especificamente pinheiros do género *Pinus*. A DMP tem graves consequências económicas e ecológicas na indústria madeireira, assim como, nos ecossistemas florestais ([Vicente et al., 2012](#)).

O NMP tem origem na América do Norte, onde não apresenta ameaça para as árvores coníferas nativas. No início do século XX, foi reportado pela primeira vez, no Japão, e a sua dispersão para outros países do continente asiático, incluindo China, Coreia e Taiwan, teve um enorme impacto negativo para os ecossistemas florestais ([Kim et al., 2020](#)). Em 1999, foi detetado em Portugal ([Mota et al., 1999](#)) na zona de Setúbal, dispersando pelo continente, na Ilha da Madeira ([Fonseca et al., 2012](#)), sendo também detetado em Espanha ([Robertson et al., 2011](#)). O NMP foi classificado como organismo de quarentena A2 pela Organização Europeia para a Proteção de Plantas (OEPP) ([EPPO, 2023](#)). Como consequência, a União Europeia (UE) tem várias restrições e sanções económicas para a circulação de produtos provenientes de áreas afetadas ([Vicente et al., 2012](#); [Sousa, et al., 2015](#)). Em Portugal, o pinheiro-bravo (*P. pinaster*) é a espécie mais suscetível à DMP e a fileira do pinho contribui cerca de 45% do volume de negócios nas indústrias madeireira (Centro PINUS, 2021). A rápida propagação da doença pode ser exponenciada pelas condições climáticas com o aumento dos períodos de seca e as temperaturas mais elevadas, ameaçando as regiões ainda não afetadas, principalmente a região mediterrânica da Europa ([Espada et al., 2022](#)). Desta forma, torna-se urgente encontrar soluções sustentáveis para controlar o NMP. Estudos anteriores mostraram que os óleos essenciais extraídos de plantas autóctones têm uma significativa atividade nematodocida ([Faria et al., 2023](#)).

2. Objetivos do trabalho

Este trabalho tem como objetivo analisar o modo de ação do composto benzaldeído (C_7H_6O) no NMP, através da avaliação da expressão diferencial de genes e compreender quais as vias metabólicas envolvidas. Os objetivos específicos do trabalho são:

- Caracterização dos genes com expressão diferencial em resposta ao benzaldeído, através da análise *in silico* dos genes, transcritos e do domínio catalítico das proteínas codificadas;
- Validação da expressão dos genes candidatos por qRT-PCR (real time PCR);
- Compreender quais as vias metabólicas que estão envolvidas na resposta ao benzaldeído.

Para cumprir os objetivos deste trabalho serão utilizadas técnicas de análise preditiva (*in silico*) e diferentes técnicas de biologia molecular.

3. Fundamento teórico

3.1 Nemátodes parasitas de plantas

Os nemátodes (Filo Nematoda) são seres multicelulares extremamente abundantes, existindo milhares de espécies descritas, que ocupam os mais variados ambientes pelo mundo. Algumas espécies são benéficas e apresentam um papel crucial em diversos ecossistemas, como por exemplo, a participação na decomposição de matéria orgânica ([Iqbal and Jones, 2016](#)). Em contraste, existem também outros nemátodes que são parasitas e causam doenças tanto em plantas e animais, como no ser humano. Estes provocam elevados danos económicos e ambientais, que são agravados pela propagação do comércio mundial, podendo ocorrer em novos ecossistemas ([Faria et al., 2021](#)). Muitas espécies de nemátodes evoluíram como NPP causando prejuízos económicos nos sistemas agrícolas e florestais ([Perry and Moens, 2011](#); [Desmedt et al., 2020](#)).

Os nemátodes possuem uma estrutura vermiforme, alongada e cilíndrica e têm sistema reprodutor, nervoso, digestivo (Figura 3.1). Não sendo uma característica única dos nemátodes parasitas, estes possuem na zona anterior do corpo uma estrutura bucal adaptada ao parasitismo – o estilete (Figura 3.1) (Hussey *et al.*, 2002). Esta estrutura tem forma de agulha e apresenta uma dupla função: mecânica para penetrar os tecidos vegetais e química porque permite secretar proteínas para o interior das células vegetais.

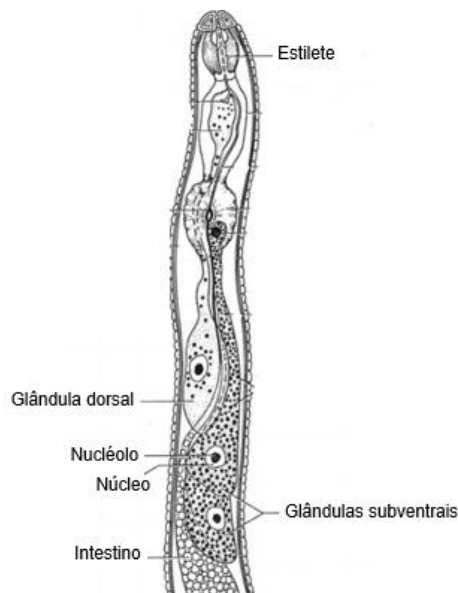


Figura 3.1 - Esquema da região anterior de um nemátode fitoparásita onde estão representados o estilete e as glândulas esofágicas (duas glândulas subventrais, subventral gland, e uma glândula dorsal, dorsal gland) (adaptado de Hussey *et al.*, 2002).

De acordo com os ciclos de vida, estes parasitas podem ser classificados como endoparasitas, quando se movimentam dentro da planta, alimentando-se e reproduzindo-se no seu interior ou ectoparasitas quando penetra parcialmente na planta para se alimentar (Figura 3.2). Alguns NPP são migratórios e todos os estádios de vida são móveis e migram nos tecidos do hospedeiro. Outros têm o seu ciclo de vida sedentário em alguns estádios de desenvolvimento, ficando numa zona específica da planta onde formam estruturas complexas de alimentação mantendo o hospedeiro vivo ([Palomares-Rius et al., 2017](#); [Topalovic and Vestergard, 2021](#)).

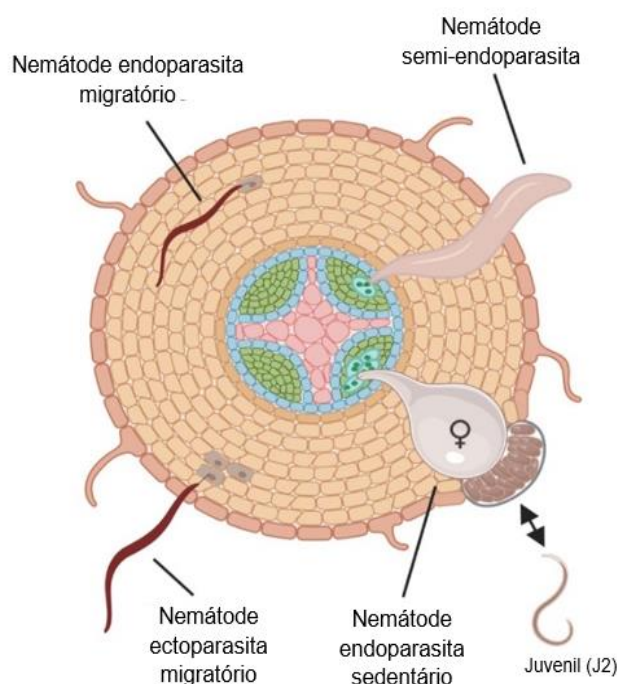


Figura 3.2 - Diferentes modos de parasitismo nos nemátodes fitoparasitas: endo e ectoparasitas migratórios e endoparasitas sedentários (adaptado de [Topalovic and Vestergard, 2021](#))

3.2 - Nemátode da madeira do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*

O NMP é um nemátode endoparasita migratório e é o responsável pela DMP, que afeta algumas espécies de coníferas do género *Pinus* (Figura 3.3 - Sintomas da DMP em pinheiros-bravos do género *Pinus* com a copa murcha e acastanhada rodeados de pinheiros assintomáticos com a copa verde localizados em Portugal (adaptado de Vicente *et al.*, 2021) (Cortesia: Prof Manuel Mota; autoestrada A6, Portugal)([Vicente et al., 2012](#); [Faria et al., 2021](#)). Esta doença é associada à redução do fluxo de oleorresina da árvore afetada, tal como o seu escurecimento/vermelhidão das agulhas, murchidão das agulhas, devido ao mecanismo de bloqueio de água e nutrientes, resultando no declínio geral da árvore infetada (Figura 3.3 - Sintomas da DMP em pinheiros-bravos do

género *Pinus* com a copa murcha e acastanhada rodeados de pinheiros assintomáticos com a copa verde localizados em Portugal (adaptado de Vicente *et al.*, 2021) (Cortesia: Prof Manuel Mota; autoestrada A6, Portugal)(Vicente *et al.*, 2012). A DMP é um sistema biológico complexo que combina três fatores importantes: o NMP, o seu inseto vector (do género *Monochamus*) e a planta hospedeira, o pinheiro (algumas espécies do género *Pinus*). O desenvolvimento do nemátode ocorre ao longo de quatro estados juvenis, J1, J2, J3 e J4, e a fase adulta (macho e fêmea) (Faria *et al.*, 2021; Kim, *et al.*, 2020).



Figura 3.3 - Sintomas da DMP em pinheiros-bravos do género *Pinus* com a copa murcha e acastanhada rodeados de pinheiros assintomáticos com a copa verde localizados em Portugal (adaptado de Vicente *et al.*, 2021) (Cortesia: Prof Manuel Mota; autoestrada A6, Portugal)

O NMP, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner, 1934, Nickle, 1970), pertence ao género *Bursaphelenchus* (Fuchs, 1937), Ordem Aphelenchida e Família Parasitaphelenchidae. (Trindade, 2012). O NMP mede cerca de 1,5mm na fase adulta, apresenta uma forma cilíndrica, não segmentada, revestida por uma cutícula que protege o nemátode. Possui sistema digestivo, excretor, nervoso e reprodutivo (Iqbal and Jones, 2016; Trindade, 2012; Pico, 2011). Nesta espécie a reprodução é sexuada, possuindo indivíduos de ambos os géneros. Os machos apresentam espículas robustas com um *cucullus* na extremidade distal. Já as fêmeas, apresentam uma prega vulvar no lábio anterior da vulva e a terminação da cauda apresenta uma forma subcilíndrica com um término arredondado (Error! Reference source not found.(Iqbal e Jones, 2016; Trindade, 2012; Pico, 2011).

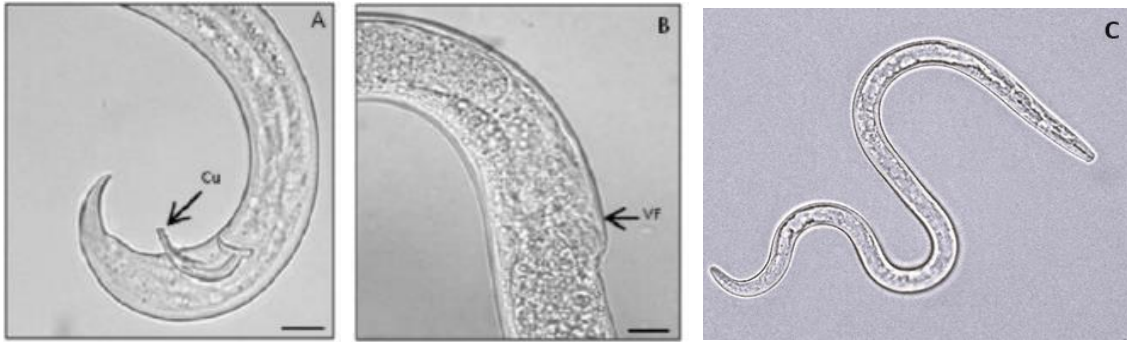


Figura 3.4 - Observação microscópica do macho e da fêmea de *Bursaphelenchus xylophilus*. A- Espícula curva do macho (Cu); B- Vulva sobreposta da fêmea (VF) Escala: Barra= 10 µm (adaptado de Trindade, 2012); C – Observação microscópica de *B. xylophilus* juvenil microscópio Leica DMi com ampliação 200x (adaptado de Madalena Mendonça, Laboratório de Nematologia, Universidade de Évora).

3.3 - Ciclo de vida do NMP

O ciclo de vida do NMP pode desenvolver-se sob duas formas, podendo ocorrer através da propagação direta no pinheiro, fase reprodutiva, ou através da transmissão para novas árvores por via de insetos vetores, fase de dispersão. Uma vez dentro da planta, o NMP têm duas fases diferentes no seu ciclo de vida (Figura 3.5 - Ciclo de vida do nemátode do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*, e doença da murchidão do pinheiro (adaptado de Pires *et al.*, 2022).

uma fase fitófaga em que se alimenta das células vegetais e uma fase micetófaga, que se alimenta de fungos endófitos da madeira ([Vicente *et al.*, 2012](#); [Espada *et al.*, 2016, 2022](#); [Vicente *et al.*, 2022](#)). Durante o processo de desenvolvimento dentro do ovo, o NMP atinge o primeiro estágio juvenil, J1, mudando para o segundo estágio juvenil, J2, com a eclosão do ovo. Conforme se vai alimentando e desenvolvendo, este atinge mais dois estádios juvenis J3 e posteriormente J4, em que há interrupção do processo de alimentação e o NMP é atraído para as câmaras pupais do inseto (larva de Dauer), acumulando reservas até que atinge a sua forma adulta, completando assim o seu ciclo de vida em 6 dias ([Vicente *et al.*, 2012](#); [Faria, *et al.*, 2021](#)). O NMP transmite-se para novos pinheiros através dos insetos vetores, entrando assim numa fase de dispersão ([Faria *et al.*, 2021](#); [Trindade, 2012](#); [Vicente *et al.*, 2012](#)).

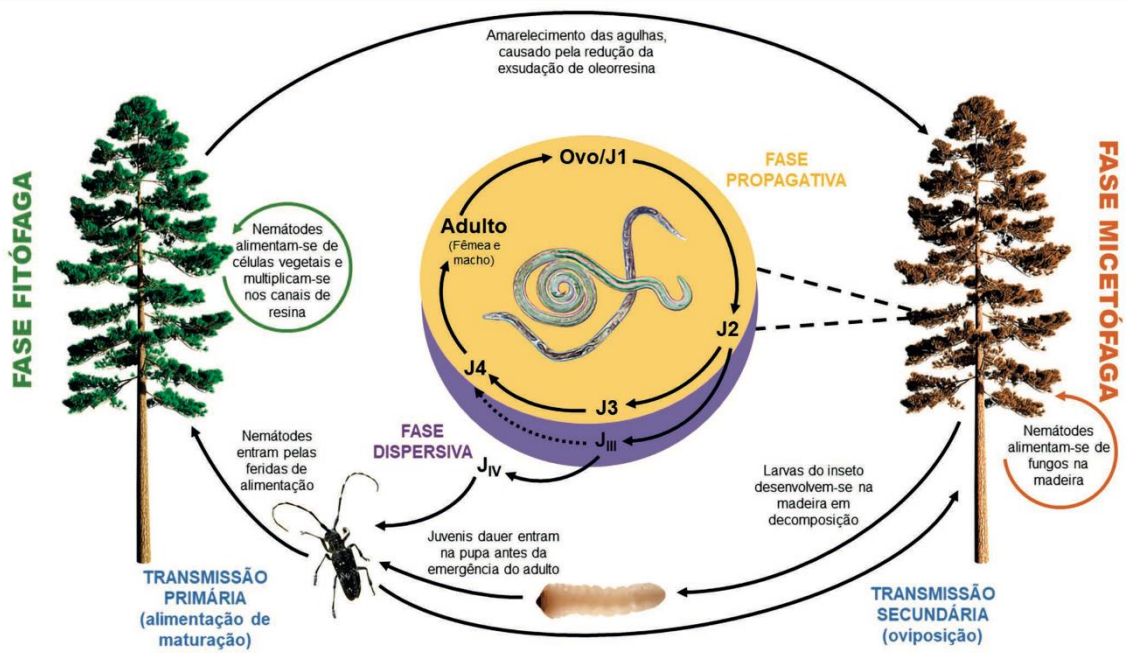


Figura 3.5 - Ciclo de vida do nemátode do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*, e doença da murchidão do pinheiro (adaptado de Pires *et al.*, 2022).

3.4 - Metodologias de controlo do NMP

De forma a proteger os pinheiros da DMP, inúmeras técnicas de controlo são atualmente implementadas. Investir no melhoramento do pinheiro-bravo, é uma estratégia longo prazo, através da identificação de fatores de resistência em árvores que não apresentam sintomas em zonas de forte incidência da doença ([Faria et al., 2023](#)). Espécies de pinheiros com suscetibilidade reduzida são cada vez mais implementadas em programas de cruzamento, resultando em híbridos mais resistentes ([Faria et al., 2021](#)). As estratégias fitossanitárias de controlo mais comuns têm como objetivo a erradicação de árvores e madeiras infetadas. Quando é identificado um foco de infeção são implementadas medidas de quarentena, onde ocorre o estabelecimento de zonas de intervenção de forma a eliminar o NMP e o inseto vetor ([Faria et al., 2021](#); [Faria et al., 2023](#)). Adicionalmente, a madeira contaminada para posterior exportação ou para fins industriais pode ser tratada por meios químicos como pulverização ou fumigação com pesticidas ou por tratamento térmico, acima de 60°C para eliminar o inseto e o nemátode ([Faria et al., 2021](#)). São por vezes utilizados composto químicos atrativos, como feromonas específicas do inseto, de modo a reduzir e controlar as populações deste nas zonas afetadas pela DMP ([Faria, et al., 2023](#)).

Os nematocidas comercializados podem apresentar toxicidade para microrganismos benéficos e animais, incluindo o ser humano. Acumulam-se nos solos e plantas, em níveis acima dos regulados, constituindo grande impacto ambiental. Nos últimos anos, surgem cada vez mais estudos que visam desenvolver um controlo ambientalmente mais seguro contra o NMP ([Faria, et al., 2023](#)).

3.4.1. Moléculas com ação nematocida derivados de plantas

Nos últimos anos tem-se desenvolvido o estudo de novos bionematocidas de ação rápida que são normalmente menos tóxicos para os organismos e com baixo impacto ambiental. Existem várias classes tais como os bionematocidas microbiológicos, que tem por base a atividade biológica antagonista de microrganismos (bactérias e fungos) que apresentam atividade nematocida devido à produção de compostos tóxicos para os NPP ([Seong et al., 2021](#); [Faria et al., 2023](#); [Sanchez-Gomez et al., 2023](#)). Outro tipo de compostos utilizados como biopesticidas são os óleos essenciais (OEs), compostos naturais provenientes de plantas e que têm atividade superior aos nematocidas (sintéticos) comerciais ([Faria et al., 2021](#)). Têm a vantagem de serem ambientalmente mais seguros, mostrando fitotoxicidade baixa e não se acumulam no meio. Por apresentarem diversas atividades biológicas são capazes de regular a praga alvo, e também espécies oportunistas e estirpes resistentes, constituindo, assim, bons agentes biopesticidas ([Faria et al., 2021](#); [Faria et al., 2023](#)).

No caso do NMP, os OEs e os seus voláteis ativos apresentam considerável atividade nematocida. Os OEs são obtidos de plantas aromáticas através de hidrodestilação obtendo-se um líquido hidrofóbico concentrado. Estes são constituídos por compostos de várias classes químicas, principalmente pertencente à classe dos terpenos, compostos fenólicos, como fenilpropanóides, e outros grupos de compostos ([Faria et al., 2021](#); [Faria et al., 2023](#)). Um exemplo é o benzaldeído (BZ), um composto de EO classificado como aldeído aromático (C₇H₆O), e que foi testado no NMP com efeito de 100% de mortalidade do NMP para uma concentração de 2mg/mL ([Faria et al., 2021](#)).

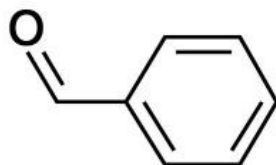


Figura 3.6 - Estrutura do benzaldeído (adaptado de Sigma-Aldrich).

3.5 – Interação entre nemátode e a planta

3.5.1 Proteínas de parasitismo dos NPP durante a infeção

As interações entre o nemátode e a sua planta hospedeira são mediadas por proteínas de parasitismo, secretadas no interior das células do hospedeiro facilitando a infeção. Muitas destas proteínas poderão ser expressas nas glândulas esofágicas e secretadas no hospedeiro através do estilete (Figura 3.7). O estudo destas proteínas de tem sido potenciado pelas plataformas de Sequenciação de nova geração (NGS) que permitiram sequenciar genomas e transcriptomas dos NPP e identificar os genes diferencialmente expressos durante a infeção, que preditivamente codificam proteínas com sinal peptídico e sem sinal transmembranar. São exemplos, proteínas capazes de degradar as paredes celulares utilizadas na migração nos tecidos vegetais (por exemplo, celulases) e moléculas que utilizam para se alimentarem dos conteúdos citoplasmáticos (exemplo, peptidases). Durante a infeção, os nemátodes também têm uma estratégia de que envolve secretar várias moléculas de defesa às respostas imunitárias do hospedeiro. No caso do NMP, existe a expressão simultânea de várias moléculas associadas à defesa, secretadas no seu intestino e nas glândulas esofágicas, como por exemplo, moléculas de detoxificação capazes de metabolizar compostos exógenos (citocromo P450, CYP450, e glutathione-S-transferase, GST) que pertencem à via metabólica de detoxificação dos compostos exógenos ([Espada et al., 2016](#); [Vieira and Gleason, 2019](#); [Espada et al., 2022](#)).

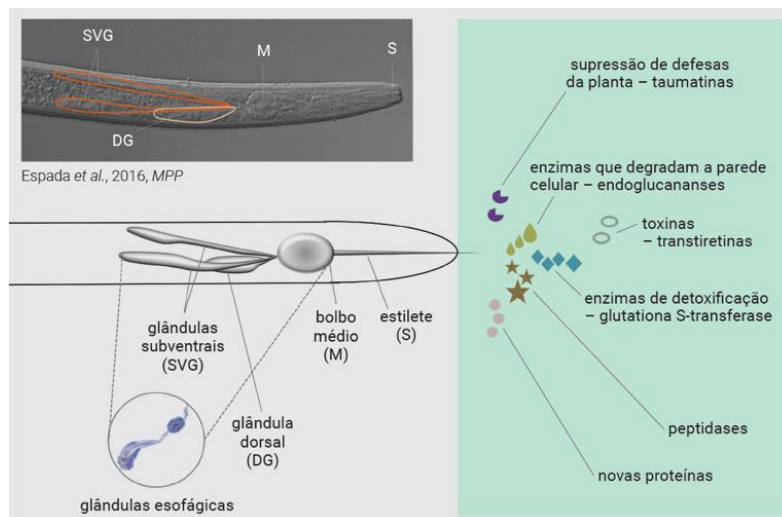


Figura 3.7 - Esquema representativo da interação entre *Bursaphelenchus xylophilus* e as células da planta hospedeira (*Pinus* sp.), mediada por proteínas relacionadas com o parasitismo e (maioritariamente) expressas nas glândulas esofágicas (SVG e DG), que estão localizadas na região anterior do nemátode. Estas proteínas são secretadas para o interior das células do hospedeiro através do estilete (S). Diferentes proteínas envolvidas no parasitismo estão envolvidas na migração, alimentação e defesas do nemátode fitoparasita; outras proteínas que não se sabe qual a sua função ("novas proteínas") e não têm similaridade com proteínas disponíveis nas bases de dados públicas (adaptado de [Espada et al.2022](#)).

3.5.2. Mecanismos de defesa das plantas contra os NPP

Todos os NPP precisam de suprimir as defesas das plantas para serem bem-sucedidos durante a infecção. Os NPP são reconhecidos pelas plantas hospedeiras através de mecanismos que ativam diversas respostas de defesa nas células e a subsequente ativação de vias de sinalização (Jones and Dangl, 2006; [Desmedt et al., 2020](#)). A presença dos NPP é detetada por moléculas que desencadeiam a reação de PTI (pattern-triggered immunity) ou resposta imune basal ([Sato et al., 2019](#)). Em resposta, as plantas produzem diferentes metabolitos que ativam o reforço das paredes celulares, depósitos de calose e também a produção de compostos envolvidos no stress oxidativo (nomeadamente ROS, espécies reativas de oxigénio), que sinalizam vias do sistema imunitário ([Sato et al., 2019](#); [Desmedt et al., 2020](#)). Os ROS são produzidos e a sua libertação atua como moléculas sinalizadoras que ativam resposta imunológicas de combate à ação dos NPP tais com respostas de hipersensibilidade ([Sato et al., 2019](#)).

Os nemátodes endoparasitas, como forma de sobrevivência à resposta defensiva da planta, desenvolveram ao nível da hipoderme e da sua superfície – a cutícula- uma série de enzimas com função antioxidante de modo a combaterem a toxicidade causada pelos ROS. Algumas enzimas tais como glutatona peroxidase e catalases, entre outras enzimas, estão envolvidas nos mecanismos de defesa dos nemátodes. No NMP, várias destas enzimas já foram identificadas como altamente expressas durante a infecção da planta ([Espada et al., 2016](#)).

4. Metodologia

4.1. Estratégia

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

Apoio financeiro: Projeto NemaWAARS – “O motif para desvendar os mecanismos de regulação de genes de parasitismo no nemátode da madeira do pinheiro para o controlo da doença e desenvolvimento de plantas resistentes” – PTDC/ASP-PLA/1108/2021

Duração: 1 semestre letivo.

Modelo biológico: *Bursaphelenchus xylophilus* (Isolado: Bx Ref, Laboratório de Nematologia, Universidade de Évora, Portugal);

4.1.1 Técnicas utilizadas

- Extração de DNA genómico;
- Quantificação de gDNA;
- Desenho de primers para PCR;
- Amplificação de genes por PCR;
- Eletroforese em gel de agarose;
- Purificação de produtos de PCR;
- Análise de sequências obtidas por sequenciação direta pelo método de Sanger;
- Desenho de primers para RT-qPCR;
- Quantificação da expressão relativa por RT-qPCR.

4.1.2 Equipamentos

- Homogeizador (Mini Bead Mill, VWR);
- Vortex (VWR INTERNATIONAL);
- Centrifuga (mini, SacanSpeed);
- Termo Bloco Seco (Thermomixer compact, Eppendorf);
- Qubit 4 Fluorometer (invitrogen);
- Termociclador (T100TM Thermal Cycler, BIO-RAD);
- Fonte de alimentação (Power Source 300V, VWR);
- Tina de eletroforese 100 mL (BIO-RAD);
- Transiluminador com luz ultravioleta (GenoView, VWR);
- Máquina fotográfica (Canon PowerShot g10);
- Termociclador qRT-PCR (Quant Gene 9600, BIOER);
- Coluna (NZYSpin Tissue Column, NZYtech).

4.1.3 Reagentes

- Agarose (NZYtech);
- Kit de extração NZY Tissue gDNA isolation kit (NZYtech);
- Kit Quibit™ 1X dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific);
- Primers (STABvida);
- Supreme NZYtaq II 2x Green Master Mix (NZYtech);
- Marcador de DNA Ladder ready-to-use (BIORON);
- Agente intercalante de DNA (Green Safe Premium, NZYtech);
- Kit MiniElute PCR Purification Kit (QIAGEN);
- Kit MiniElute Gel Extraction Kit (QIAGEN);
- Kit Super Script III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen);
- SensiFAST™ SYBR Lo-ROX Kit (BIOLINE).

4.2. Caracterização e identificação dos genes com expressão diferencial em resposta ao benzaldeído

Foi realizado, previamente a este estudo, um ensaio *in vitro* do NMP exposto ao BZ, composto com efeito nematocida. Esse ensaio em triplicado, composto por 3 tratamentos: controlo com o nemátode em água destilada (dH₂O); o nemátode exposto ao BZ dissolvido no solvente DMSO (sulfóxido de dimetilo); o nemátode exposto apenas ao solvente DMSO. Os nemátodes foram recolhidos ao fim de 5 minutos expostos aos tratamentos e o RNA total foi extraído e sequenciado por RNA-seq. De uma lista de genes do NMP diferencialmente expressos em resposta ao BZ foram selecionados 8 genes, com o intuito de validar a sua expressão.

4.2.1. Análise *in silico* de genes candidatos de *B. xylophilus*

De modo a caracterizar os oito genes que foram propostos neste trabalho, realizou-se uma análise preditiva. Na base de dados *WormBase ParaSite v.WBPS19* (<https://parasite.wormbase.org/index.html>; [Howe et al., 2017](#)) foi possível recolher informações preditivas sobre os genes, transcritos e domínio catalítico das proteínas codificadas. De modo a caracterizar a proteínas codificadas pelos genes em estudo utilizou-se o software *InterPro v.100.0* (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>, [Paysan-Lafosse et al., 2022](#)), que permitiu identificar o tamanho da proteína, a sua função e domínio, e a que via metabólica esta está inserida. Utilizou-se o software *BLASTP v.2.15.0* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) de modo a estudar a similaridade das proteínas preditas com outras espécies. O programa software *Exon-Intron Graphic Maker v.4*

(<http://wormweb.org/exonintron>) permitiu fazer um esquema ilustrativo das e intrões regiões não codificantes (intrões) e regiões codificantes (exões).

4.3. Validação dos genes candidatos

4.3.1. Extração e quantificação de DNA genómico

De forma a extrair o DNA genómico de *B. xylophilus*, é necessário provocar a lise do nemátode e, para tal efeito, utilizou-se esferas metálicas e um homogeneizador (Mini Bead Mill, VWR). A homogeneização foi realizada durante 6 segundos (speed 3) e repetiu-se 3 vezes nas mesmas condições.

Para o isolamento do DNA genómico utilizou-se o kit de extração *NZY Tissue gDNA isolation kit* (NZYtech), seguindo as instruções de acordo com o fabricante. De modo a fazer a lise (química) da amostra, adicionou-se 180 µL de buffer NT1 e 25 µL de proteinase K, com o intuito de clivar as proteínas e separá-las do DNA. Homogeneizou-se a amostra no vortex (VWR INTERNATIONAL), em seguida, incubou-se a 56°C no termo bloco (Thermomixer compact, Eppendorf) com agitação 350 rpm durante 2h30m. Posteriormente, adicionou-se 200 µL de buffer NL e homogeneizou-se durante 10s no vortex. Em seguida, adicionou-se 210 µL de etanol a 100%, de modo a ajudar na precipitação do DNA, homogeneizando-se novamente através do vortex. Transferiu-se o lisado para uma coluna (NZYSpin Tissue Column, NZYtech) inserida num microtubo de 2 mL. Centrifugou-se a coluna durante 1 min a 12300 rpm, descartou-se o filtrado. Procedeu-se à lavagem da coluna, primeiro com 500 µL de buffer NW1, centrifugando a 12300 rpm durante 1 min, e por fim, com 600 µL de buffer NW2, centrifugando novamente a 12300 rpm durante 1 min. Descartou-se o filtrado, centrifugou-se novamente nas mesmas condições com o objetivo de limpeza adicional de possíveis resíduos de etanol e para secar a membrana. De seguida, descartou-se o filtrado e colocou-se a coluna num novo tubo 1,5 mL. Adicionou-se 25 µL de buffer NE diretamente na membrana da coluna e deixou-se repousar durante 1 min. Por fim, centrifugou-se durante 2 min a 12300 rpm, eluiu-se o gDNA do NMP no fundo do tubo.

A quantificação da concentração do gDNA foi realizado por fluorometria através do Qubit 4 Fluorometer (invitrogen) e utilizando o kit Quibit™ 1X dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific), de acordo com a bula fornecida pelo fabricante.

4.3.2. Desenho de primers para amplificação de genes candidatos por PCR

A técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) permite a amplificação de inúmeras cópias de fragmentos alvo de DNA. Para que a reação ocorra, é necessário a utilização de um par de pequenos segmentos, os *primers* (oligonucleótidos). Este par liga-se por complementariedade em zonas específicas da sequência de DNA

pretendida, possibilitando a amplificação do fragmento entre os dois locais de ligação dos *primers* à sequência.

Para validar os genes preditos por PCR, foi necessário desenhar *primers* forward (5'-3') e reverse (3'-5') a partir das sequências de gDNA como molde, utilizando o *software* online *Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator* (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>). Para amplificar o comprimento total de cada gene candidato, selecionou-se entre 18-23 bp no início (*forward*) e no final (*reverse*) da sequência de DNA genómico. Para cada par de *primers* avaliou-se a percentagem de guanina-citocina (GC%), que deve estar entre 40-60%, de modo a garantir uma distribuição uniforme das bases azotadas. O programa calculou a temperatura de *melting* (T_m), que deve ter um valor superior a 50°C. Posteriormente, verificou-se a complementaridade da sequência selecionada, de modo a garantir que os *primers* não hibridem em locais inespecíficos, formando estruturas secundárias indesejadas. As sequências de *primers* utilizadas e respetivos parâmetros estão indicados na tabela 5.2.

Os *primers* foram sintetizados pela STABvida, Portugal (<https://www.stabvida.com/pt>). As soluções stock de *primers* liofilizados, foram hidratados com água destilada esterilizada até à concentração final de 100 μ M. Através destas soluções stock, prepararam-se soluções de trabalho para cada *primer* com concentração de 10 μ M. As soluções stock foram guardadas a -20°C, de modo a evitar a evaporação.

4.3.3. Amplificação de genes candidatos por PCR

Para cada gene candidato, a reação de PCR foi a seguinte: adicionou-se 5,1 ng gDNA do organismo em estudo, 0,68 μ M de primer forward e 0,68 μ M de primer reverse, ambos específicos ao fragmento alvo, indicado no anexo A, e 0,05 U *Supreme NZY Taq II 2x Green Master Mix* (NZYtech), que contém dNTPs, a DNA Taq polimerase, o buffer da reação e o cofator MgCl₂. O programa de reação de amplificação foi realizado no termociclador (T100TM Thermal Cycler, BIO-RAD), que ocorreu em várias fases: a desnaturação inicial do DNA a 95°C durante 3 minutos; repetição de 34 ciclos, em cada ciclo apresenta uma etapa de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, seguida da etapa de annealing (hibridação) com temperatura específica para cada par de *primers* (indicada na tabela 5.2) e duração de 30 segundos, uma etapa final de extensão a 72°C com duração específica dependendo do tamanho da sequência alvo que se pretende amplificar, indicado na tabela 5.2. Por fim, numa última fase, ocorre uma extensão final a 72°C durante 5 minutos.

4.3.4. Eletroforese em gel de agarose

A técnica de eletroforese horizontal em gel de agarose permitiu visualizar e validar os produtos de PCR obtidos. Preparou-se o gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X e adicionando, 0,8 µL de agente intercalante de DNA (Green Safe Premium, NZYtech). Homogeneizou-se a mistura e verteu-se no berço de eletroforese, colocou-se o pente e deixou-se solidificar o gel durante 35 min. Posteriormente, transferiu-se o gel para a tina de eletroforese e adicionou-se ao primeiro poço 4 µL do marcador de *DNA Ladder ready-to-use* (BIORON) e 5 µL de cada amostra. A corrida de eletroforese foi realizada durante 40 minutos a 85V (Power Source 300V (VWR)). O gel de agarose foi observado no transiluminador com luz ultravioleta (GenoView, VWR) e a imagem foi registada através de um sistema de fotodocumentação associado (Canon PowerShot g10).

4.3.5. Purificação, sequenciação de DNA e análise de sequências

Após a amplificação de cada gene por PCR, é necessário a sequenciação direta para validação. Para tal, procedeu-se à purificação dos fragmentos amplificados. Este processo foi realizado de duas formas: i) diretamente do produto de PCR, utilizando o kit *MiniElute PCR Purification Kit* (QIAGEN); ii) cortar o fragmento de DNA de interesse a partir do gel de agarose utilizando o kit *MiniElute Gel Extraction Kit* (QIAGEN). Para ambos os kits seguiram-se os protocolos de acordo com o fabricante.

Para a extração a partir do gel de agarose, as bandas correspondentes ao tamanho do fragmento alvo foram cortadas no transiluminador, com o auxílio de um bisturi, diretamente para um microtubo de 2 mL. Registou-se a massa do gel, através de uma balança analítica, com o microtubo previamente tarado. Adicionou-se 3 volumes de *buffer* QG para 1 volume do gel. Colocou-se a incubar durante 10 min no termo bloco (Thermomixer compact, Eppendorf) a 50°C, a cada intervalo de 2-3 minutos colocou-se o tubo no vortex (VWR INTERNATIONAL) de modo a ajudar a dissolver o gel. Adicionou-se 10 µL de acetato de sódio (3 M; pH 5.0) e, em seguida, um volume do gel de isopropanol. Toda a solução foi aplicada numa coluna *MinElute*, que tem afinidade para o DNA. Esta foi inserida num tubo de 2 mL e centrifugou-se durante 1 min a 13000 rpm, descartando-se o filtrado. Adicionou-se 500 µL de *buffer* QG na coluna, centrifugando novamente nas mesmas condições e descartando o filtrado. De seguida, adicionou-se 750 µL de *buffer* PE, centrifugou-se durante 1 min a 13000 rpm e descartou-se o filtrado, repetiu-se novamente a centrifugação, como forma de limpeza adicional para retirar excessos que tenham ficado retidos e voltou-se a descartar. Deixou-se repousar entre 2-5 min, e colocou-se a coluna num microtubo de 1,5 mL, eluindo-se diretamente no

filtro da minicoluna com 12 µL de *buffer* EB. Deixou-se repousar e posteriormente centrifugou-se novamente a coluna durante 1 min a 13000 rpm, descartando-a no final.

Na purificação, a partir dos produtos de PCR, estes foram sujeitos a uma pequena centrifugação na minicentrífuga, de modo a homogeneizar a mistura. Mediu-se o volume do produto de PCR de cada gene e adicionou-se 5 volumes de *buffer* PB à mistura. A amostra foi aplicada a uma coluna MinElute inserida num tubo de 2 mL, posteriormente, centrifugou-se durante 1 min a 13000 rpm, descartando-se o filtrado. Adicionou-se à coluna 750 µL de *buffer* PE e centrifugou-se novamente nas mesmas condições, descartou-se o filtrado. Repetiu-se todo o último passo, adicionando novamente 750 µL de *buffer* PE. Em seguida, realizou-se uma centrifugação adicional como forma de limpeza, durante 1 min a 13000 rpm. Colocou-se a coluna num microtubo de 1,5 mL, adicionando-se diretamente no filtro da coluna 12 µL de *buffer* EB. Repousou durante 1 min e centrifugou-se novamente às mesmas condições. Por fim, descartou-se a coluna, obtendo-se o DNA purificado no fundo do microtubo.

Após a purificação, adicionou-se em microtubos 1,5 mL, 10 µL de produto de PCR purificado e 3µL de primer forward específico de cada gene. A sequenciação dos produtos de PCR purificados foi realizada pela empresa *Stabvida* (Portugal), pelo método direto de Sanger. Os resultados obtidos pela sequenciação direta foram interpretados utilizando o *software BioEdit v.7.2* (https://bioedit.software.informer.com/Hall_1999). Por forma a verificar a similaridade entre as sequências obtidas e as inicialmente previstas, (pela base de dados WormBase ParaSite) foi utilizado o *software* de alinhamento de sequências *Clustal W Multiple alignment v. 2.1* (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>).

4.3.6. Síntese de cDNA e amplificação de transcritos por RT-PCR

A partir de RNA de *B. xylophilus* previamente extraído para os três tratamentos (controlo, DMSO e BZ), foi sintetizado o cDNA (cadeia simples). Para a síntese de cDNA utilizou-se o kit *Super Script III First-Strand Synthesis System* for RT-PCR (Invitrogen) com concentração final de 150ng, procedendo-se de acordo com a bula fornecida pelo fabricante.

A amplificação dos transcritos (comprimento total) a partir do cDNA sintetizado foi feito através da técnica de reação em cadeia de polimerase com transcrição reversa (RT-PCR), utilizando par de primers específicos para cada gene validado. Os volumes dos reagentes usados na reação de RT-PCR, são semelhantes ao descrito em 4.3.3. O programa de amplificação utilizado é semelhante às condições anteriormente descritas para o PCR, alterando apenas a duração da etapa de extensão, que foi reduzida para 2 min, uma vez que os transcritos apresentam menor tamanho que os genes que os

originam. Os produtos de RT-PCR foram validados através de eletroforese horizontal em gel de agarose a 1%, seguindo as mesmas condições e protocolo utilizados em 4.3.4.

4.4. Análise quantitativa da expressão relativa dos genes validados por qRT-PCR

4.4.1 Desenho de primers para qRT-PCR

Para a técnica de reação em cadeia de polimerase em tempo real (qRT-PCR) foi necessário desenhar um novo conjunto de pares de *primers*, para tal, utilizou-se o *Primer3 Input v. 4.1.0* (<https://primer3.ut.ee/>). Este programa permitiu-o selecionar um par de primers, com o tamanho entre 18-23bp, que ao hibridarem permitam a amplificação de sequências entre 100 a 200 bp. Os fragmentos amplificados deverão ser específicos de cada transcrito. As sequências de *primers* desenhados, juntamente com a respetiva temperatura de melting e percentagem de guanina-citocina estão indicadas na tabela 5.3. Este conjunto de primers foi sintetizado pela *STABvida*, Portugal (<https://www.stabvida.com/pt>). Os *primers* liofilizados foram hidratados e prepararam-se soluções de trabalho como anteriormente descrito em 4.3.2 e estão indicados na Tabela 5.3.

4.4.2 Quantificação da expressão relativa dos genes candidatos por qRT-PCR

A técnica de reação em cadeia de polimerase em tempo real (qRT-PCR) permite a amplificação e quantificação relativa e absoluta de DNA de uma amostra. A quantificação é obtida através de corantes fluorescentes que se intercalam à cadeia de DNA, quando excitadas estas moléculas emitem fluorescência, neste ensaio utilizou-se o SYBR® Green. A fluorescência ao ser detetada é convertida em quantidade de produto amplificado durante cada ciclo. O número de ciclos a partir da qual a fluorescência da reação é detetada corresponde ao valor de CT. O sinal de fluorescência emitido é diretamente proporcional à quantidade de produto que é amplificado, representado por uma curva sigmoide, demonstrado na Figura 4.8 ([Oliveira, 2010](#)).

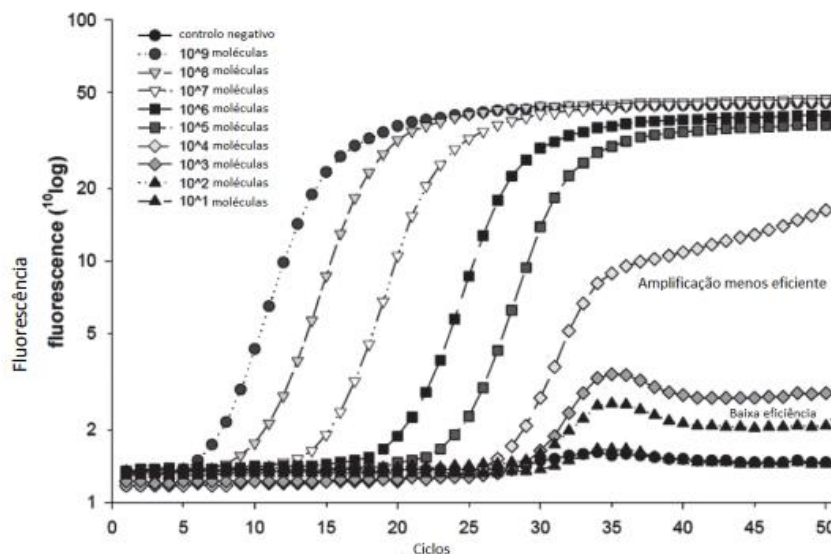


Figura 4.8 - Representação gráfica de resultados de amplificação por qRT-PCR (Adaptado de [Oliveira, 2010](#))

A técnica de qRT-PCR permitiu quantificar a expressão relativa dos genes anteriormente validados para as três condições em estudo (controle, DMSO e BZ). A quantificação da expressão relativa descreve a expressão de um gene de interesse num tratamento comparado com a expressão do mesmo gene em outro tratamento. É utilizado como gene de referência, cuja expressão não é alterada (gene constitutivo) para a normalização da expressão dos genes em estudo. Para cada condição e para todos os genes validados, preparou-se a reação constituída por 0,42 μ M de cada primer (forward e reverse) específicos (Tabela 5.3) 10 μ L de *SensiFAST SYBR Lo-ROX Kit* (BIOLINE) perfazendo-se, com água destilada esterilizada, para um volume de 19 μ L. Em placas de 96 poços (Nerbe Plus) para cada condição adicionou-se 19 μ L da mix anterior e 1 μ L de cDNA para perfazer um volume final de reação de 20 μ L. Para cada condição e gene foram realizadas três réplicas técnicas. No equipamento de real time PCR (Quant Gene 9600, BIOER), através do programa Gene-9600, fez-se o seguinte programa de reação: desnaturação a 95°C durante 2 min para a ativação da polimerase, seguido de 40 ciclos, com a temperatura de desnaturação a 95°C durante 5 segundos fase de annealing a 60°C durante 10 segundos.

A quantificação da expressão relativa é feita utilizando o algoritmo de normalização $2^{-\Delta\Delta CT}$ ([Livak et al., 2001](#)), que permite a quantificação relativa da expressão de cada gene nas diferentes condições (controle, DMSO e BZ). Este algoritmo compara as condições através de um calibrador e um gene de referência, a actina. O gene de alvo e o calibrador são normalizados com o gene de referência, através das seguintes fórmulas:

$$\Delta CT (\text{calibrador}) = CT (\text{calibrador alvo}) - CT (\text{calibrador referência}) (1)$$

$$\Delta CT (\text{amostra}) = CT (\text{amostra alvo}) - CT (\text{amostra referência}) (2)$$

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

De modo a verificar se existe variações significativas da expressão relativa dos genes entre as três condições, utilizou-se o *software jamovi v.2.3.28* (<https://www.jamovi.org/download.html>), realizando-se uma análise de variância ANOVA, pelo teste Post-Hoc de Tukey, com valores de significância * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

4.5. Diagrama do trabalho experimental

Na Figura 4.9 está representado o diagrama ilustrativo das etapas da metodologia realizada.

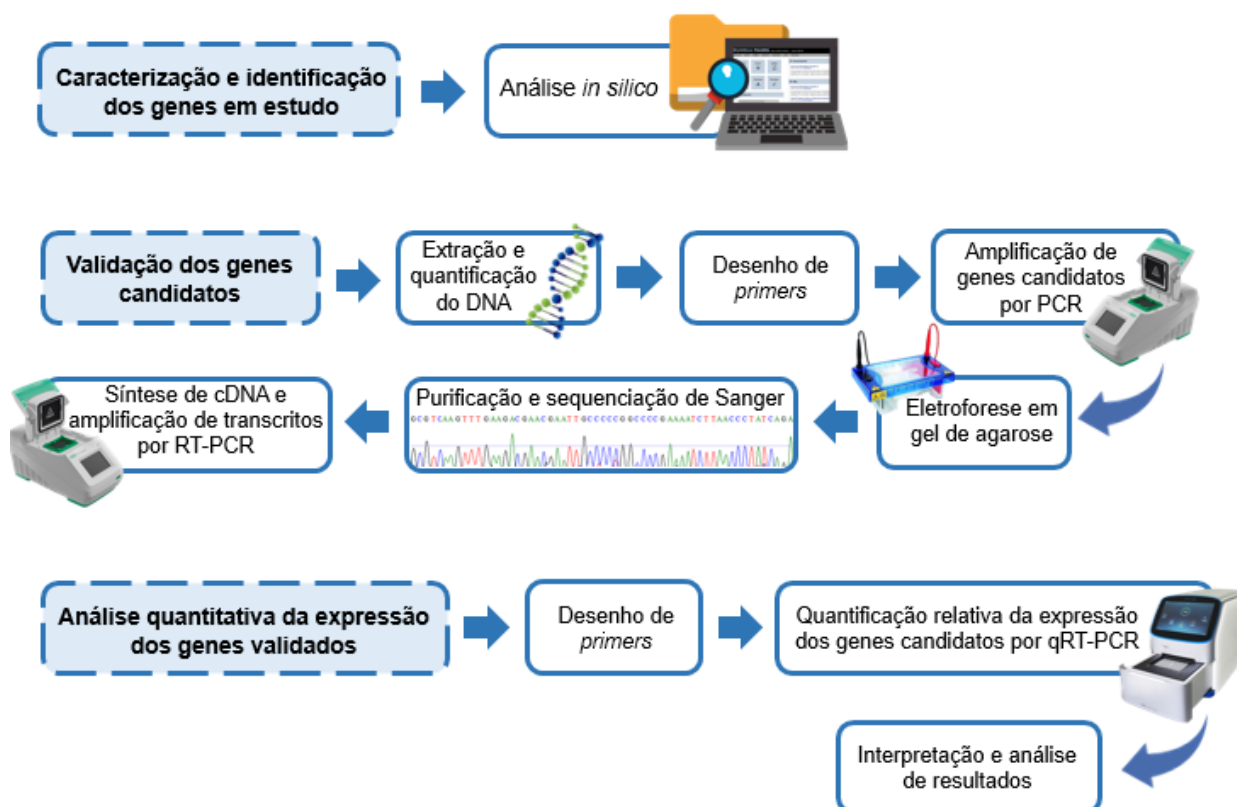


Figura 4.9 - Diagrama ilustrativo do trabalho experimental

5. Resultados Experimentais e Discussão

5.1 Caracterização e identificação dos genes com expressão diferencial em resposta ao benzaldeído

Neste estudo pretende-se avaliar a expressão diferencial de 8 genes quando o NMP foi exposto ao BZ. Para tal, recorreu-se a várias bases de dados, referidas em 4.2.1 da metodologia, para caracterizar cada gene, transcrito, domínio catalítico das proteínas codificadas e identificar as respetivas vias metabólicas envolvidas. Utilizando o programa *BLASTP v.2.15.0*, analisou-se também a similaridade das sequências de proteínas do organismo em estudo com outras espécies. Os resultados da análise *in silico* estão apresentados na Tabela 5.1. O programa *Exon-Intron Graphic Maker v.4* desenhou um esquema preditivo, que ilustra os exões e intrões para cada gene, indicado na Figura 5.10.

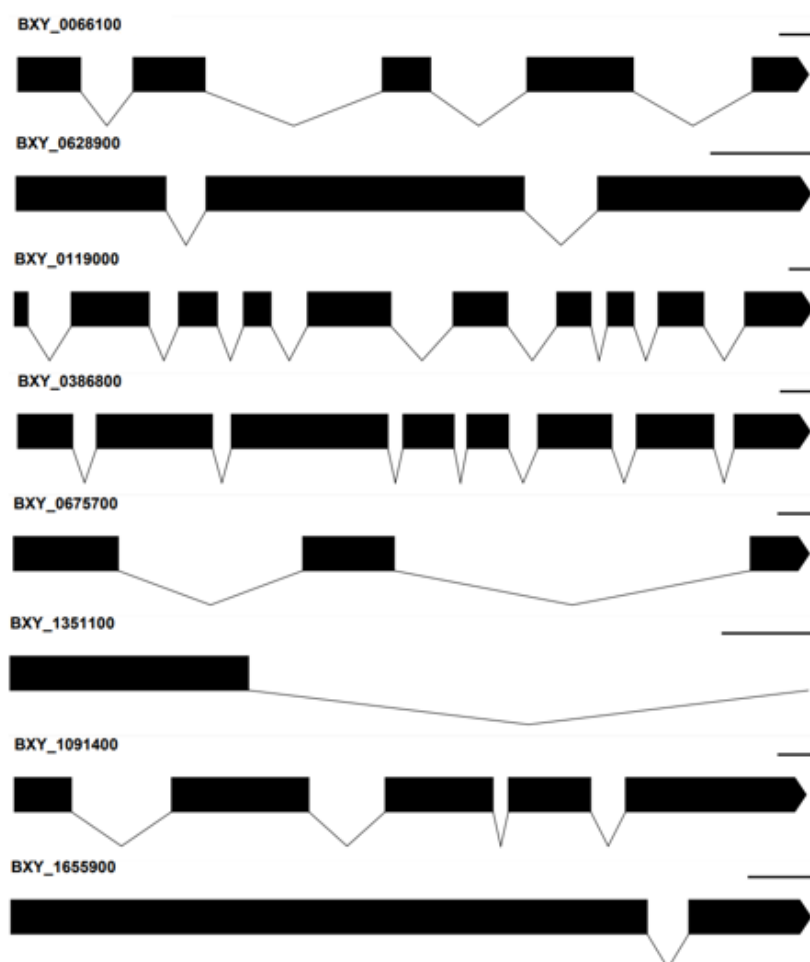


Figura 5.10 - Esquema de ilustrativo exões e intrões para cada gene em estudo.

Tabela 5.1 - Análise *in silico* dos genes, transcritos e proteínas codificantes em estudo

Identificação do gene	Tamanho do gene (bp)	Tamanho do cDNA (bp)	Tamanho da proteína (aa)	Massa da proteína (g/mol)	Ponto isoeletrico	BLASTP (Porcentagem de similaridade; e-value)	Domínio e Família (InterPro ID)
BXY_0119000	2569	1515	504	57806,77	6,776	<i>Bursaphelenchus okinawaensis</i> (44,86%; 2E-136)	IPR001128: Citocromo P450
BXY_0386800	2118	1719	572	66085,68	9,1871	<i>Bursaphelenchus okinawaensis</i> (91,61%; 0)	IPR036188: Superfamília com domínio de ligação FAD/NADP IPR000960: Flavina monoxigenase
BXY_1091400	3432	1593	530	60324,45	8,9224	<i>Bursaphelenchus okinawaensis</i> (65,89%; 0)	IPR002213: UDP-glucuronosiltransferase
BXY_0628900	735	630	209	23675,13	9,7808	<i>Bursaphelenchus okinawaensis</i> (63,64%; 3E-88)	IPR004046: Glutaciona-S-transferase, C-terminal IPR004045: Glutaciona-S-transferase, N-terminal IPR036249: Superfamília semelhante à tioredoxina
BXY_1351100	1458	258	86	9429,94	8,8654	<i>Bursaphelenchus okinawaensis</i> (89,55%; 4E-33)	IPR029058: alfa/beta Hidrolase IPR002018: Carboxilesterase, tipo B
BXY_0066100	2162	945	314	36149,33	9,8799	<i>Bursaphelenchus okinawaensis</i> (39%; 6E-67)	IPR019426: Recetor de serpentina, classe V
BXY_0675700	2073	657	218	23206,91	4,4126	<i>Steinernema hermaphroditum</i> (51,18%; 1E-47)	IPR002486: Colagénio cuticular de nemátode, N-terminal
BXY_1655900	2336	1077	358	40483,45	7,6156	<i>Bursaphelenchus okinawaensis</i> (95%; 3E-177)	IPR011021: Semelhante à arrestina, C-terminal IPR014752: Semelhante à arrestina, N-terminal IPR014756: Imunoglobulina, conjunto E

O gene BXY_0119000 apresenta um tamanho para a sequência genômica e codificante preditas de, respectivamente, 2569 bp e 1515 bp. Esta proteína apresenta um tamanho 504 aa, massa prevista de 57806,77 g/mol e ponto isoelétrico de 6,776. Relativo a este gene está o domínio funcional, CYP450 (IPR001128). As enzimas do CYP450 são uma superfamília de monoxigenases que contêm um grupo prostético heme. Desempenham um papel principal na fase I do metabolismo de xenobióticos, capaz de catalisar a sua biotransformação oxidativa ([Lindblom et al., 2006](#)). O CYP450 via mono-oxigenação é capaz de metabolizar uma variedade de substratos, podendo também atuar como peroxidases ou redutases ([Matousková et al., 2016](#)). A reação catalítica do CYP450 consiste incorporação de um átomo de oxigênio para o substrato, em diferentes tipos de reações, como por exemplo, hidroxilação aromática ou linfática, epoxidação, desaminação oxidativa, desalogenação oxidativa, N- ou S-oxidação ([Esteves et al., 2021](#)).

O gene BXY_0386800 apresenta um tamanho predito de 2118 bp para a sequência genômica e 1719 bp para a codificante. A proteína predita apresenta um tamanho predito de 572 aa, massa prevista de 66085,68 g/mol e ponto isoelétrico de 9,1871. A este gene está associado o domínio de flavina monoxigenase (FMO) (IPR000960). As FMOs são uma família de enzimas presentes no metabolismo de xenobióticos, catalisam a oxidação de substratos endógenos. Estas enzimas utilizam FAD como grupo prostético, NADPH como dador de elétrons e oxigênio como co-substrato, para que ocorra a adição de um átomo de oxigênio a compostos que contenham nitrogênio, enxofre ou outros átomos nucleofílicos, de modo a aumentar a solubilidade e posteriormente a excreção de xenobióticos ([Huang et al., 2021](#); [Bhat et al., 2024](#)). O domínio de superfamília com domínio de ligação FAD/NADP (IPR036188), está associado a monoxigenases dependentes de FAD ([Mascotti et al., 2016](#)).

Ao gene BXY_1091400 correspondeu um tamanho predito de 3432 bp e 1593 bp, respectivamente, para as sequências genômica e codificante. Um tamanho de 530 aa, 60324,45 g/mol de massa e 8,9224 par o ponto isoelétrico da proteína predita. O domínio presente a este gene é de UDP-glucuronosiltransferase (IPR002213). As UDP-glucuronosiltransferases (UGT) são uma família de enzimas que catalisam reações de glucuronidação ([Rowland et al., 2013](#)). Estão envolvidas na fase II do metabolismo de xenobióticos, constituindo uma via de eliminação de subprodutos lipofílicos deste metabolismo ([Matousková et al., 2016](#)). As UGT catalisam a reação de conjugação covalente de um grupo glicosil a grupos funcionais de compostos lipofílicos, utilizando como cofatores doadores UDP, como o ácido UDP-glucurônico ([Rowland et al., 2013](#)). Aumentando a hidrofiliabilidade e a disponibilidade para recetores ([Matousková et al., 2016](#)).

O gene BXY_0628900 apresenta um tamanho predito de 735 bp para a sequência genômica e 630 bp para a codificante. Esta proteína apresenta um tamanho 209 aa, massa prevista de 23675,13 g/mol e ponto isoelétrico de 9,7808. A este gene estão associados os domínios funcionais são GST, C-terminal (IPR004046) e GST, N-terminal (IPR004045).

O equilíbrio redox no organismo é controlado pela ação de dois sistemas, glutatona (GSH) e tioredoxina (Trx). (Fata *et al.*, 2022) Envolvidas na fase II da desintoxicação de compostos eletrofílicos ([Matoušková *et al.*, 2016](#)), a GST, proporciona uma defesa contra o dano oxidativo e tem um papel crucial no metabolismo de composto exógenos. Esta enzima catalisa a reação de conjugação com a GSH reduzida com compostos eletrofílicos reativos, de modo a aumentar a solubilidade e posterior secreção ([Matoušková *et al.*, 2016](#); Espada *et al.*, 2016).

Ao gene BXY_0628900 está ainda associado o domínio de superfamília semelhante à Trx (IPR036249). A Trx, por sua vez, é reduzida a partir de NADPH catalisado pela tioredoxina redutase (TrxR) ([Fata *et al.*, 2022](#)), tendo um papel crucial no sistema antioxidante que controla a equilíbrio redox do organismo. Esta enzima pertence a uma família de enzimas dissulfeto oxidoredutases ([Bjørklund *et al.*, 2021](#)).

O gene BXY_0066100 apresenta um tamanho predito de 2162 bp para a sequência genômica e 945 bp para a codificante. A proteína predita apresenta um tamanho predito de 314 aa, massa prevista de 36149,33 g/mol, ponto isoelétrico de 9,8799. Associado a este gene está o domínio de recetor de serpentina, classe V (IPR019426). Os recetores de serpentina (SRs) são proteínas integradas na membrana acoplados à proteína G. A ligação ao recetor de ligandos do meio é traduzida num sinal químico através da membrana, permitindo a comunicação entre a célula e o meio envolvente ([Tchoufack *et al.*, 2020](#)) Estes recetores acoplados a proteína G (GPCR) continuam uma família de recetores à superfície celular, que atuam como quimiorreceptores, permitindo reconhecer estímulos moleculares do meio ([Jiang *et al.*, 2023](#)).

O gene BXY_1351100 apresenta um tamanho predito de 1458 bp e 258 bp para as sequências genômica e codificante, respetivamente. A proteína predita apresenta um tamanho predito de 86 aa, massa prevista de 9429,94 g/mol e ponto isoelétrico de 8,8654. A este gene está associado o domínio, hidrolase alfa/beta (IPR029058). As hidrolases alfa/beta são uma superfamília de proteínas encontradas na grande maioria dos domínios, englobando peroxidases, lipases, proteases, esterases entre outras ([Pusch *et al.*, 2022](#)).

Este gene também apresenta domínio de carboxilesterase, tipo B (IPR002018). Estas enzimas estão envolvidas no processo de detoxicação, e catalisam a reação de

hidrólise de vários xenobióticos que contém ésteres e amidas. As carboxilesterases são enzimas expressas no retículo endoplasmático e citoplasma de vários tecidos, principalmente em tecidos com função de barreira e possivelmente expostos a xenobióticos ([Lan et al., 2020](#); [Hatfield et al., 2016](#)).

O gene BXY_0675700 apresenta um tamanho predito de 2073 bp e o transcrito um tamanho predito de 657 bp. A proteína predita codificada por este gene apresenta um tamanho predito de 218 aa, massa prevista de 40483,45 g/mol e ponto isoelétrico de 4,4126. A este gene está associado o domínio colagénio cuticular de nemátode N-terminal (IPR002486). A função deste domínio é desconhecida.

O gene BXY_1655900 apresenta um tamanho predito de 2336 bp para a sequência genómica e 1077 bp para a codificante. Para a proteína predita obteve-se um tamanho de 358 aa, 60324,45 g/mol de massa e 7,6156 para o ponto isoelétrico. Este gene apresenta os domínios de imunoglobulina E (IPR014756) e de semelhante à arrestina N e C terminal (respetivamente IPR014752, IPR011021). As proteínas da família da arrestina atuam como recetores de sinalização, tendo um importante papel na endocitose de proteínas transmembranares, através de um antagonista externo, que é recruta por GPCRs ativado ou outros recetores de membrana, inativando o recetor, levando à terminação do sinal da proteína G ([Zhou et al., 2022](#)).

A similaridade das proteínas preditas pelos 8 genes em estudo foi comparada com outras espécies, Tabela 5.1, utilizando o *software BLASTP v.2.15.0*. Entre os 8 genes candidatos, 7 apresentaram similaridade com proteínas de um organismo do mesmo género do NMP, a espécie *Bursaphelenchus okinawaensis*. Os genes BXY_0386800, BXY_1351100 e BXY_1655900 apresentam elevada percentagem de similaridade, 91,61%, 89,55% e 95%, respetivamente. Enquanto os genes BXY_0119000, BXY_1091400, BXY_1351100, BXY_0628900 e BXY_0066100 apresentam percentagem de similaridade mais baixa, entre 65,89% e 39%, pelo que estas proteínas são bastante diferentes entre os dois organismos. O gene BXY_0675700 apresenta similaridade de 51,18% com o nemátode da espécie *Steinernema hermaphroditum*.

5.2 Validação dos genes candidatos

O gDNA extraído do nemátode foi quantificado por fluorometria através do Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen) obtendo-se uma concentração de 3,4 ng/μL. Através da técnica de PCR foi feita a amplificação dos genes candidatos a partir do gDNA anteriormente extraído. As sequências de primers utilizadas e respectivos parâmetros estão indicados na tabela 5.2. Os resultados da amplificação através de eletroforese em gel de agarose a 1% podem ser observados na Figura 5.11.

Tabela 5.2 - Lista de primers para cada gene candidato e respectivas sequências, temperatura de melting e annealing percentagem de GC e tempo de extensão, condições utilizadas na amplificação por PCR.

Gene ID	Primers	Sequência	Tm	GC	Ta	Tempo de Extensão
BXY_1091400	BXY_1091400_FL_F	5'-GAGGGGTTCTATTTTCATAGAAGC-3'	53.5°C	43%	48°C	4 min
	BXY_1091400_FL_R	5'-CGTCGAAGTTCAAGAAGCCATTC-3'	55.3°C	48%		
BXY_0066100	BXY_0066100_FL_F	5'-ATGGAAGATCTAACAGGAGAATA-3'	50.55°C	34.78%	48°C	4 min
	BXY_0066100_FL_R	5'-CTAAATAGTCAACGCTGAGATG-3'	51°C	40.91%		
BXY_0119000	BXY_0119000_FL_F	5'-ATGTTTTGGCTGCTAATAGCCG-3'	55.96°C	45.45%	48°C	4 min
	BXY_0119000_FL_R	5'-TTAGATCTCTTCGACGATGAGT-3'	52.64°C	40.91%		
BXY_0628900	BXY_0628900_FL_F	5'-ATGGTGCAATACAAGCTCACCT-3'	56.87°C	45.45%	51°C	1 min
	BXY_0628900_FL_R	5'-GCTGTTTTGTTGCGTTGAGCAA-3'	57.46°C	45.45%		
BXY_0386800	BXY_0386800_FL_F	5'-ATGGTGATAAGGGTCTGTGTAA-3'	53.26°C	40.91%	52°C	1 min
	BXY_0386800_FL_R	5'-CTCATGTCTGACTGTAGATCG-3'	52.06°C	47.62%		
BXY_0675700	BXY_0675700_FL_F	5'-ATGGTGGAAGTGGAGTCGCT-3'	58.65°C	55%	52°C	3 min
	BXY_0675700_FL_R	5'-GTACCCAGAACATTGATGCCAC-3'	56.13°C	50%		
BXY_1655900	BXY_1351100_FL_F	5'-GTCCATTTGTCCAACCGAATT-3'	53.64°C	42.86%	48°C	3 min
	BXY_1351100_FL_R	5'-TTTCCCTACCTCAAATCTCAGC-3'	54.47°C	45.45%		
BXY_1351100	BXY_1655900_FL_F	5'-GTAAGTGTACAAGTAGATTCTA-3'	49.09°C	34.78%	48°C	3 min
	BXY_1655900_FL_R	5'-CCACTGCTCAGGGTCTTTTCT-3'	57.02°C	52.38%		

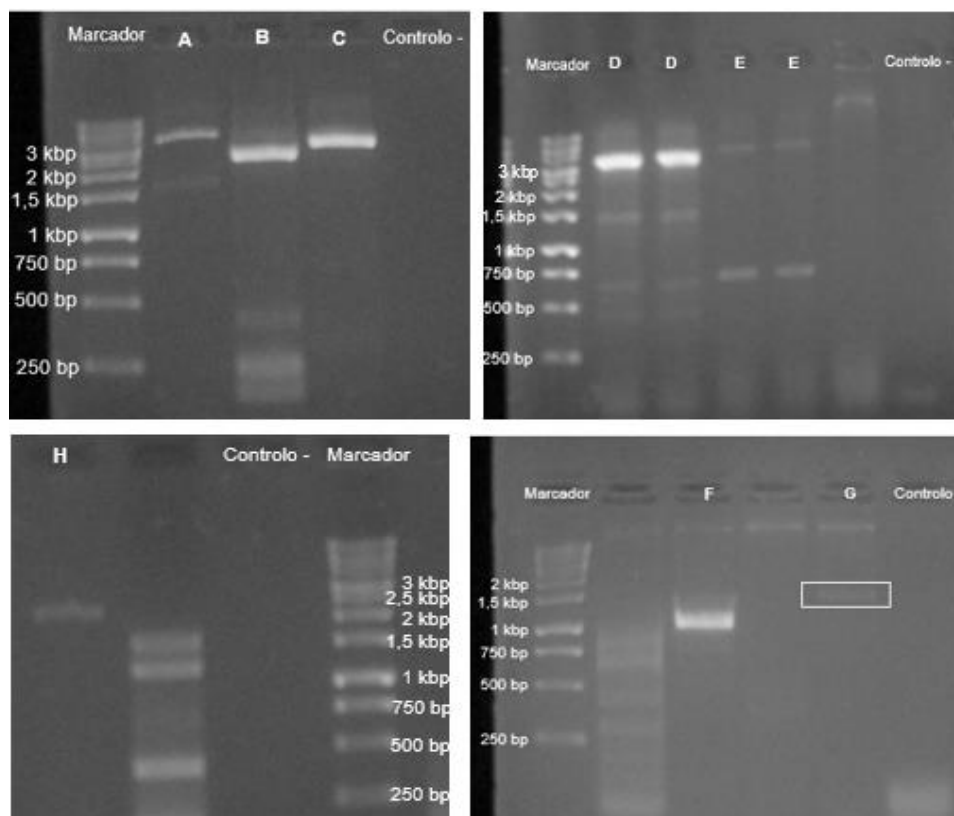


Figura 5.11 - Visualização por eletroforese em gel de agarose dos resultados da amplificação dos 8 genes candidatos por PCR. A- BXY_1091400; B- BXY_0066100; C- BXY_0119000; D- BXY_0675700; E- BXY_0628900; F- BXY_1351100; G- BXY_1655900; H- BXY_0386800; Controlo -: controlo negativo; Marcador: 1 kb DNA Ladder ready-to-use (BIORON).

A partir da visualização do gel de agarose, verificou-se que os genes BXY_0119000 (C) e BXY_0386800 (H) obtiveram uma única banda com tamanho do fragmento próximo ao tamanho predito (Tabela 5.1). Os genes BXY_0066100 (B), BXY_1091400 (A), BXY_0628900 (E) também apresentaram uma banda com o tamanho predito, porém, verificou a presença de bandas secundárias, como possível resultado da existência de uma família de genes, que causa a hibridação dos primers em zonas não desejadas do template. No caso dos genes BXY_0675700 (D), BXY_1351100 (F) e BXY_1655900 (G) o tamanho predito do fragmento de DNA seria, respetivamente, próximo dos 2073 bp, 1458 bp e 2336 bp. Porém, o obtido no gel foi de aproximadamente 3000 bp para o gene BXY_0675700, 1000 bp para o gene BXY_1351100 e entre 1500 a 2000 bp para o gene BXY_1655900. É importante referir que o tamanho das sequências de cada gene obtidas em 4.2.1 são predições, pelo que, podem não corresponder ao tamanho das sequências obtidas. Neste ensaio não existiu nenhuma contaminação, uma vez que no controlo negativo não se verificou nenhuma banda.

Após a sequenciação direta pelo método de Sanger, o *software BioEdit v.7.2* permitiu editar as sequências e o *software Clustal W Multiple alignment v. 2.1* o seu

alinhamento (entre sequências obtidas pela sequenciação direta e sequências inicialmente preditas através da base de dados WormBase ParaSite v.WBPS19). Apenas o gene BXY_0675700 não foi validado, pois não foi possível alinhar ambas as sequências. Os resultados obtidos para o emparelhamento das sequências obtidas e preditas do gene BXY_1351100 estão indicados na Figura 5.12. No anexo A estão representados a análise das sequências feita através dos *softwares Clustal W Multiple alignment v. 2.1* e *BioEdit v.7.2* para o gene BXY_0386800.

```

Sequenciação      -----GAAAACCTCTTTGGCCCCGCCCCGGCGACGAAC
Predito           GTCCATTTGTCCAACCGAATTTCCGATTGACCTTTTGCGCCCGCCCCGGCGACGAAC
                  **  *** **  ***** *****

Sequenciação      AGGTTTTCCGTCCTCCCGCAGTCAATATTCCATATACATGTGGGAGAGAGTGTGTTTTT
Predito           AGGTTTTCCGTCCTCCCGCAGTCAATATTCCATATACATGTGGGAGAGAGTGTGTTTTT
                  *****

Sequenciação      TTTGGCTGACATTACGAACATACTTTTATGATTTGCGACATTTTTCAAGATTAGTG-GGG
Predito           TTTGGCTGACATTACGAACATACTTTTATGATTTGCGACATTTTTCAAGATTAGTGAGGG
                  ***** **

Sequenciação      AAATGATGGATTATTATTATTAGCGATAAAGTGGGAAAAAGTGGTGTATATTAATTTTGA
Predito           AAATGATGGATTATTAT --- TAGCGATAAAGTGGGAAAAAGTGGTGTATATTAATTTTGA
                  *****

Sequenciação      GATGTTGAGAAATAAAAAATTCTATTTTTCTCCAGAATTTATAAAACCCATTCTCTGA
Predito           GATGTTGAGAAATAAAAAATTCTGTTTTTTGAAAAATTTCAAAAAATTCGATTTTTTGA
                  ***** * * ***** * **** * *** * **

Sequenciação      CTACNAAATAATGAAGGTGCCACCTTACTGACTTCCCCCCCCCTCCACCTTCA-----
Predito           AAATAAGATTTTTTTATAAAAAAATACAAAAAATAAAAAAATAAAAAATTCAAAAAA
                  * * ** * * * * * * * * * * *

Sequenciação      -----
Predito           TAAATTTTTTAAAAATAAGATTTTTTAATAAAAAAATCAAAAAATCTATTTTTTTTTTGA

```

Figura 5.12 - Alinhamento da sequência predita e obtidas pela sequenciação direta Sanger para o gene BXY_1351100 através do *software Clustal W Multiple alignment v. 2.1*.

Após a validação dos genes em estudo, amplificou-se os transcritos por RT-PCR através do cDNA sintetizado para os três tratamentos (controlo, DMSO e BZ), em triplicado. Foi possível validar todos os transcritos dos genes validados. Os resultados obtidos foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose, observados na Figura 5.13.

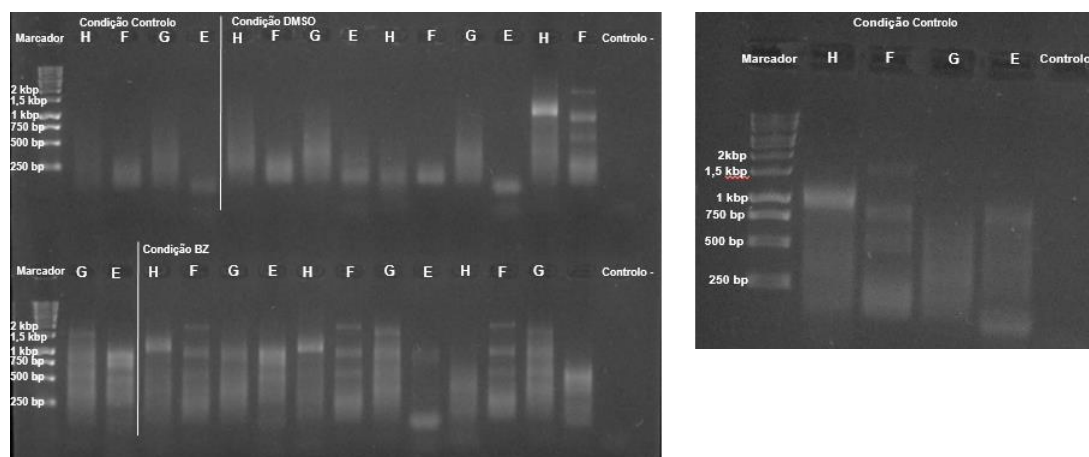


Figura 5.13 - Visualização por eletroforese em gel de agarose dos resultados da amplificação dos transcritos dos genes candidatos por RT-PCR, nos três tratamentos em triplicado. E- BXY_0628900; F- BXY_1351100; G- BXY_1655900; H- BXY_0386800; Controle -: controle negativo; Marcador: 1 kb DNA Ladder ready-to-use (BIORON).

5.3 Análise quantitativa da expressão relativa dos genes validados por qRT-PCR

A técnica de qRT-PCR permitiu avaliar a expressão relativa dos 7 genes validados. Estes genes foram normalizados em relação a um gene de referência, o gene que codifica a actina, através do algoritmo $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak *et al.*, 2001), para as três condições em estudo (controle, DMSO e BZ). Os resultados referentes a cada gene estão indicados na Figura 5.14 e correspondente análise estatística em anexo B. As sequências de primers utilizadas e respetivos parâmetros estão indicados na Tabela 5.1.

Tabela 5.3 - Lista de primers e respetivas sequências, temperatura de melting e percentagem de GC para cada transcrito para amplificação qRT-PCR

Transcript ID	Primers	Sequência	Tm	GC	Product size
Actina	ACT_qRT_F	5'-CATCCTCCGTCTCGACTTGG-3'	-	-	150bp
	ACT_qRT_R	5'-ATGTCACGCACGATTTACAG-3'	-	-	
BXY_1091400	BXY_1091400_qRT_F	5'-AAATCAGCCCAACAAGCC-3'	53.59 °C	50%	150bp
	BXY_1091400_qRT_R	5'-ACAGCGAAAAATCCGATGAC-3'	53.45 °C	45%	
BXY_0066100	BXY_0066100_qRT_F	5'-TCTCAACGCCCAATCAACC-3'	55.50 °C	52.63%	176bp
	BXY_0066100_qRT_R	5'-TAAATCCGCAGCTCTCGATCC-3'	56.80 °C	52.38%	
BXY_0119000	BXY_0119000_qRT_F	5'-TTCTTCCGTCATCTTTCTCATC-3'	52.30 °C	40.91%	169bp
	BXY_0119000_qRT_R	5'-TTCTTTTAGCCTGCCTTTCC-3'	52.99 °C	45%	
BXY_0628900	BXY_0628900_qRT_F	5'-ACCCTATTAGAGACCAACTTCC-3'	53.51 °C	45.45%	150bp
	BXY_0628900_qRT_R	5'-CGATGACTGCTTGCTCAAC-3'	54.12 °C	52.63%	
BXY_0386800	BXY_0386800_qRT_F	5'-TCCTACTCCGATTTCCACC-3'	56.11 °C	55%	144bp
	BXY_0386800_qRT_R	5'-CCGATAGACCTGTTTCACATCC-3'	55.14 °C	50%	
BXY_1655900	BXY_1655900_qRT_F	5'-ACTCAGCCATTTTTCTGCTC-3'	53.23 °C	45%	126bp
	BXY_1655900_qRT_R	5'-TTCTCAATTTCAACACATCAC-3'	52.76 °C	40.91%	
BXY_1351100	BXY_1351100_qRT_F	5'-CACAAATTACTCTCGCTTCTCC-3'	53.46 °C	45.45%	147bp
	BXY_1351100_qRT_R	5'-TTCTCCACGAATCCAATGAC-3'	52.86 °C	42.86%	

No gene BXY_0119000 verificou-se um aumento significativo ($p < 0,01$) da expressão relativa do gene na condição BZ em relação à condição controlo e à condição DMSO. Não existiu diferenças significativas entre a condição DMSO em relação ao controlo. No gene BXY_1351100 e no gene BXY_1091400 também se verificou um aumento significativo ($p < 0,001$) entre a condição BZ em relação ao controlo. O gene BXY_0628900 apresentou um aumento significativo ($p < 0,01$) entre a condição DMSO e BZ. Estes genes codificam proteínas envolvidas nas vias de desintoxicação de xenobióticos, pelo que o aumento da sua expressão é desencadeado pela necessidade do nematode se proteger contra o efeito do BZ. O gene BXY_0386800 foi o único gene deste estudo, que apresentou diminuição significativa ($p < 0,05$) na condição BZ em relação ao controlo. Tal pode significar que este gene ao ter a sua expressão diminuída é diretamente afetado pelo BZ.

Os genes BXY_0066100 e BXY_1655900 não demonstraram diferenças significativas da sua expressão quando expostos à condição BZ em comparação ao controlo. Como estes dois genes não tem variação da sua expressão quando em contacto com o BZ, podemos afirmar que estes genes não estão envolvidos na resposta do nematode ao composto e que não são afetados diretamente pelo BZ. A condição DMSO é utilizada como controlo positivo neste ensaio, uma vez que o DMSO é solvente do BZ. Pelo que se pretende que a condição controlo e DMSO tenham o mesmo comportamento semelhante, significando que a variação da expressão é causada pela exposição BZ e não do DMSO na condição BZ.

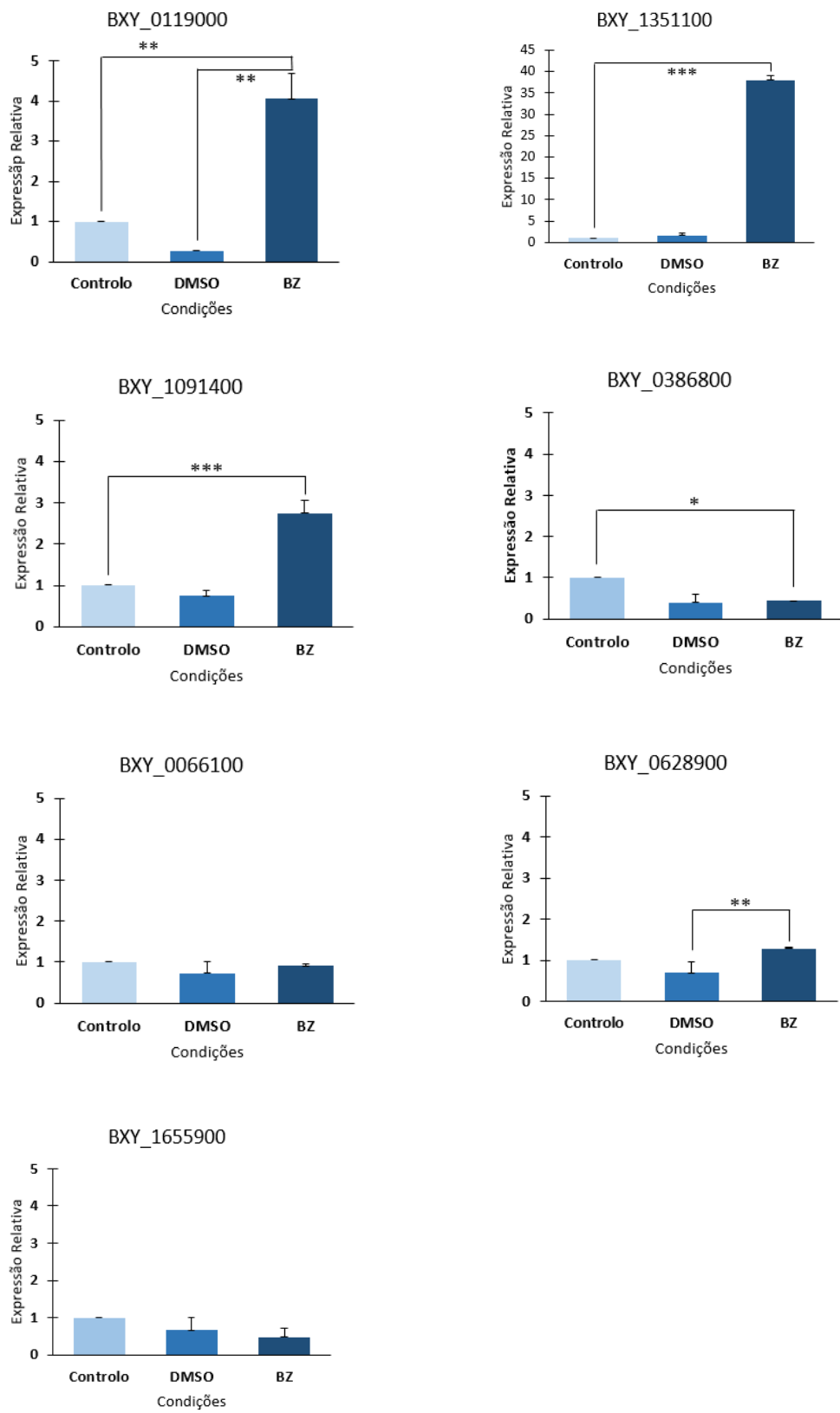


Figura 5.14 - Comparação da expressão relativa de cada gene entre as condições em estudo (controle, DMSO e BZ). As diferenças significativas entre condições estão assinaladas com os símbolos (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$).

O nemátode quando exposto a substâncias exógenas, como o BZ (composto de efeito nematocida), procura solubilizar as moléculas através das vias de detoxificação dos xenobióticos. O organismo responde através do aumento de expressão de proteínas envolvidas no metabolismo de detoxificação dessas substâncias, como meio de sobrevivência ([Cao et al., 2023](#)).

Os genes onde se verificou o aumento da expressão quando exposto à condição BZ, codificam proteínas envolvidas no metabolismo de xenobióticos: citocromo P450 (BXY_0119000), carboxilesterases (BXY_1351100), UDP-glucuronosiltransferase (BXY_1091400) e GST (BXY_0628900). Estes genes tem a sua expressão aumentada como mecanismo de defesa contra o efeito nematocida causado pelo BZ, ou seja, o aumento da sua expressão é desencadeado pela necessidade do nematocida se proteger. O organismo quando exposto a compostos potencialmente tóxicos responde através de inúmeros processos bioquímicos, onde o composto após ser absorvido, é biotransformado em substâncias hidrofílicas mais fáceis de excretar. Esta via metabólica divide-se em duas fases, na fase I, ocorre oxidação, redução e hidrólise do xenobiótico, existindo modificação de grupos funcionais na estrutura do composto endógeno. Na fase II, ocorre reações de conjugação entre os metabolitos da fase I e grupos endógenos, de modo a facilitar a excreção ([Matousková et al., 2016](#)).

As FMOs proteínas codificadas pelo gene BXY_0386800, tiveram a sua expressão diminuída na condição BZ em relação ao controlo. O BZ afetou diretamente a expressão destas proteínas pertencentes à fase I da via de detoxificação de xenobióticos. Ao ocorrer inibição da ação destas proteínas no metabolismo deste composto, a resposta fica comprometida e o nemátode não consegue decompor o BZ, tornando-se tóxico e resultando na morte do organismo.

6. Conclusões

Compreender o modo de ação de compostos com efeito nematodocida, como o BZ, no NMP, permite desenvolver estratégias de controlo deste fitoparasita. Neste estudo caracterizou-se e identificou-se através da análise *in silico* 8 genes pertencentes a uma lista de genes do NMP diferencialmente expressos em resposta ao BZ. Apenas 7 genes e os seus respetivos transcritos foram validados. Análise quantitativa da expressão relativa dos genes validados por qRT-PCR permitiu compreender quais os genes que tem a sua expressão aumentada ou diminuída quando o NMP é exposto ao BZ. Quatro dos genes validados demonstraram aumento da sua expressão diferencial possivelmente provocada pela necessidade o nemátode dar resposta ao BZ, uma vez que as proteínas codificadas por estes genes (CYP450, carboxilesterases, UDP-glucuronosiltransferase e GST) estão envolvidas na via de detoxificação de xenobióticos. Para um dos genes a expressão diferencial foi diminuída quando exposto ao BZ, concluindo-se que o composto afetou a expressão da proteína codificada (FMOs) por este gene. Como as FMOs atuam na via de detoxificação de xenobióticos, a resposta do organismo fica comprometida, levando à morte do NMP.

Referências Bibliográficas

Bhat, A., Carranza, F. R., Tuckowski, A. M. and Leiser, S. F. (2024). Flavin-containing monooxygenase (FMO): Beyond xenobiotics. *BioEssays*, 2400029. DOI: <http://doi.org/10.1002/bies.202400029>.

Bjørklund, G., Zou, L., Wang, J., Chasapis, C. T. and Peana, M. (2021). Thioredoxin reductase as a pharmacological target. *Pharmacological Research*, vol.174, 105854. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105854>.

Cao, J., Hao, X., Li, Y., Tan, R., Cui, Z., *et al.* (2023). Exploring the role of detoxification genes in the resistance of *Bursaphelenchus xylophilus* to different exogenous nematicidal substances using transcriptomic analyses. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol.194,105527. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105527>.

Centros PINUS (2021). A Fileira do pinho em 2020 – Indicadores da fileira do pinho. Outubro 2021 (6ª edição digital anual “Indicadores da Fileira do Pinho”)

Desmedt, W., Mangelinckx, S., Kyndt, T. and Vanholme, B. (2020). A Phytochemical Perspective on Plant Defense Against Nematodes. *Frontiers in Plant Science*, vol. 11. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.602079>.

EPPO (2023). EPPO Global Database. <https://gd.eppo.int>

Espada, M., Mendonça, M., Mota, M. and Inácio M.L. (2022). Parasitismo no nemátode da madeira do pinheiro – estudo dos mecanismos de regulação de genes para controlo da doença. *Agrotec*, vol. 45, 64-65.

Espada, M., Silva, A. C., Akker, S. E. V. D., Cock, P. J. A., Mota, M. and Jones, J. T. (2016). Identification and characterization of parasitism genes from the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* reveals a multilayered detoxification strategy. *Molecular plant pathology*, vol. 17, 286-295. DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.12280>.

Espada, M., Jones, J. T. and Mota, M. (2016). Characterization of glutathione S-transferases from the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Nematology*, vol. 18, 697-709. DOI: <https://doi.org/10.1163/15685411-00002985>.

Esteves, F., Rueff, J. and Kranendonk, M. (2021). The Central Role of Cytochrome P450 in Xenobiotic Metabolism - A Brief Review on a Fascinating Enzyme Family. *Jornal of Xenobiot*, vol. 11, 94-114. DOI: <https://doi.org/10.3390/jox11030007>.

Faria, J. M. S., Barbosa, P., Vieira, P., Vicente, C. S. L., Figueiredo, A. C., Mota, M. (2021). Phytochemicals as Biopesticides against the Pinewood Nematode *Bursaphelenchus xylophilus*: A Review on Essential Oils and Their Volatiles. *Plants*, vol. 10, 2614. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10122614>

Faria, J. M. S., Cavaco, T., Nunes, J. C., Gonçalves, D., Vicente, C. S. L., Pires, D., Bonifácio, L., and Inácio, M. L. (2023). O Nemátode da Madeira do Pinheiro: Novas Abordagens de Controlo e Monitorização. *Vida Rural*, 60–64.

Fata, F., Gencheva, R., Cheng, Q., Lullo, R., Ardini, M., Silvestri, I., Gabriele, F., Ippoliti, R., Bulman, C. A., Sakanari, J. A., Williams D. L., Arnér, E. S. J. and, Angelucci, F. (2022). Biochemical and structural characterizations of thioredoxin reductase selenoproteins of the parasitic filarial nematodes *Brugia malayi* and *Onchocerca volvulus*. *Redox Biology*, vol.53, 102278. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102278>.

Fonseca, L., Cardoso, J.M.S., Lopes, A., Pestana, M., Abreu, F., Nunes, N., Mota, M., and Abrantes, I. (2012). The pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in Madeira Island. *Sciendo*, vol. 49, 96–103. DOI: <https://doi.org/10.2478/s11687-012-0020-3>.

Hall, T.A. (1999) BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.

Hatfield, M. J., Umans, R. A., Hyatt, J. L., Edwards, C. C., Wierdl, M., Tsurkan, L., Taylor, M. R. and Potter, P.M. (2016). Carboxylesterases: General detoxifying enzymes. *Chemico-Biological Interactions*, vol. 259, 327-331. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2016.02.011>.

Howe, K.L., Bolt, B.J., Shafie, M., Kersey, P. and Berriman, M. (2017). WormBase ParaSite – a comprehensive resource for helminth genomics. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 215, 2-10. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.11.005>

Huang, S., Howington, M. B., Dobry, C. J., Evans, C. R. and Leiser, S. F. (2021). Flavin-Containing Monooxygenases Are Conserved Regulators of Stress Resistance and Metabolism. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 9, 630188. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.630188>.

Hussey, R. S., Davis, E. L., Baum, T. J. (2002). Secrets in secretions: genes that control nematode parasitism of plants. *Braz. J. Plant Physiol*, vol. 14, 183-194. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1677-04202002000300002>.

Iqbal, S., and Jones, M. G. K. (2016). Nematodes. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, vol. 3, 113–119. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00061-7>.

Jiang, Y., Huang, M., Qin, R., Jiang, D., Chang, D., Xie, Y., Li, C. and Wang, C. (2023). Full-Length Transcriptome Analysis of Soybean Cyst Nematode (*Heterodera glycines*) Reveals an Association of Behaviors in Response to Attractive pH and Salt Solutions with Activation of Transmembrane Receptors, Ion Channels, and Ca²⁺ Transporters. *AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY*, vol. 71, 8778-87. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c00908>.

Jones, J.T., Haegeman, A., Danchin, E.G.J., Gaur, H.S., Helder, J., Jones, M.G.K., Kikuchi, T., Manzanilla-López, R., Palomares-Rius, E.J., Wesemael, W.M.L. and Perry, R.N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, vol. 14, 946-961. DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.12057>.

Kim, B., Kim, J.H., Ahn, J., Kim, S., Cho, B., Kim, Y. and Min, J. (2020). A short review of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. In *Toxicology and Environmental Health Sciences*, vol. 12, 297–304. Korean Society of Environmental Risk Assessment and Health Science. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13530-020-00068-0>

Lan, L., Ren, X., Yang, J., Liu, D. and Zhang, C. (2020). Detection techniques of carboxylesterase activity: An update review. *Bioorganic Chemistry*, vol. 94, 103388. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103388>.

Lindblom, T. H. and Dodd, A. (2006). Xenobiotic Detoxification in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY*, 720–730. DOI: <https://doi.org/10.1002/jez.a.324>.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} Method. *Methods*, vol.25, 402-408. DOI: <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Mascotti, M. L., Ayub, M. J., Furnham, N., Thornton, J. M., and Laskowski, R. A. (2016). Chopping and Changing: the Evolution of the Flavin-dependent Monooxygenases. *J. Mol Biol* vol. 428, 3131–3146. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2016.07.003>.

Matousková, P., Vokrál, I., Lamka, J. and Skálová, L. (2016). The Role of Xenobiotic Metabolizing Enzymes in Anthelmintic Deactivation and Resistance in Helminths. *Trends in Parasitology*, vol. 32, 481-491 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2016.02.0044>.

Mota, M. M., Braasch, H., Bravo, M. A., Penas, A. C., Burgermeister, W., Metge, K. and Sousa, E. (1999). First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology*, vol. 1, 727-734. DOI: <https://doi.org/10.1163/156854199508757>.

Oliveira, T. M. S. (2010). PCR em tempo real: método e aplicações. [Master's thesis, Universidade de Aveiro]. <https://ria.ua.pt/handle/10773/7230>.

Palomares-Rius, J. E., Escobar, C., Cabrera, J., Vovlas, A. and Castillo, P. (2017). Anatomical Alterations in Plant Tissues Induced by Plant-Parasitic Nematodes. *Frontiers in Plant Science*, vol.8, 1987. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01987>.

Paysan-Lafosse, T., Blum, M., Chuguransky, S., Grego, T., Pinto, B. L., Salazar, G. A., Bileschi, M. L., Bork, P., Bridge, A., Colwell, L., Gough, J., Haft, D. H., Letunić, I., Marchler-Bauer, A., Mi, H., Natale, D. A., Orengo, C. A., Pandurangan, A. P., Rivoire, C., Sigrist, C. J. A., Sillitoe, I., Thanki, N., Thomas, P. D., Tosatto, S.C.E., Wu, C. H., Bateman, A. (2023). InterPro in 2022. *Nucleic Acids Research*, 51, 418-427. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac993>.

Perry, R. N. and Moens, M. (2011). Introduction to Plant-Parasitic Nematodes; Modes of Parasitism. In: *Genomics and Molecular of plant-Nematode Interactions*, Jones, J., Gheysen, G., Fenoll, (eds), Springer, 3-20. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-007-0434-3_1.

Pico, F. C. M. A. (2011). Efeito do nemátode do pinheiro no módulo de elasticidade da madeira de pinheiro-bravo. Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia. [Master's thesis, Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia]. <https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/4160>.

Pires, D., Vicente, C. S. L., Faria, J. M. S., Mota, M. and Inácio, M.L. (2022). Pinhal sustentável: o combate ao nemátode da madeira do pinheiro com fungos antagonistas. *Vida Rural*, 72-77. https://dspace.uevora.pt/rdpc/bitstream/10174/32355/1/2022_Pires%20et%20al.%2c%20Vida%20Rural.pdf

Pusch, L., Riegler-Berket, L., Oberer, M., Zimmermann, R. and Taschler, U. (2022). α/β -Hydrolase Domain-Containing 6 (ABHD6) - A Multifunctional Lipid Hydrolase. *Metabolites*, vol.12, 761. DOI: <https://doi.org/10.3390/metabo12080761>.

Robertson, L., Arcos, S.C., Escuer, M., Merino, R.S., Esparago, G., Abelleira, A. and Navas A. (2011). Incidence of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* Steiner & Buhrer, 1934 (Nickle, 1970) in Spain. *Nematology*, vol. 13, 755-757. DOI: <http://doi.org/10.1163/138855411X578888>.

Rowland, A., Miners, O. M. and Mackenzie, P. I. (2013). The UDP-glucuronosyltransferases: Their role in drug metabolism and detoxification. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol.45, 1121-1132. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2013.02.019>.

Sánchez-Gómez, T., Harte, S. J., Zamora, P., Bareyre, M., Díez, J. J., Herrero, B., Niño-Sánchez, J., and Martín-García, J. (2023). Nematicidal effect of *Beauveria* species and the mycotoxin beauvericin against pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Frontiers in Forests and Global Change*, vol, 6. DOI: <https://doi.org/10.3389/ffgc.2023.1229456>.

Sato, K., Kadota, Y. and Shirasu, K. (2019). Plant Immune Responses to Parasitic Nematodes. *Frontiers in Plant Science*, vol.10, 1165 DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01165>.

Seong, J., Shin, J., Kim, K., Cho, B. (2021). Microbial production of nematicidal agents for controlling plant-parasitic nematodes. *Process Biochem*, vol.108, 69-79. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.06.006>.

Sousa, E., Vale, F., & Abrantes, I. M. O. (2015). Doença da murchidão do pinheiro na Europa. *Interações Biológicas e Gestão integrada*. <http://id.bnportugal.gov.pt/bib/bibnacional/1914051>.

Tchoufack, E. J. N., Hahnfeld, L., Pitschelatow, G., Bennink, S. and Pradel, G. (2020). The endoplasmic reticulum-resident serpentine receptor SR10 has important functions for asexual and sexual blood stage development of *Plasmodium falciparum*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, vol.239, 111315. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2020.111315>.

Topalovic, O., and Vestergard, M. (2021). Can microorganisms assist the survival and parasitism of plant-parasitic nematodes? *Trends in Parasitology*, vol.37, 947–958. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.05.007>.

Trindade, C. S. M. P. P. (2012). Avaliação de expressão de genes relacionados coma a susceptibilidade a *Bursaphelenchus xylophilus*, agente causal da doença da murchidão dos pinheiros (pine wilt disease) em *Pinis pinaster* Ait e *Pinus yunannensis* Franch. [Master's thesis, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências]. <https://repositorio.ul.pt/handle/10451/7966>.

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

Vicente, C., Faria, J., Teixeira, D., Vieira, P., Espada, M., Barbosa, P., Figueiredo, J., Cardoso, J., Esteves, I., Varela, R., Nobrega, F. and Inacio, M. (2021). Plant Metabolomics for the control of the root-lesion nematode *Pratylenchus penetrans*.

Vicente, C., Faria, J., Espada, M., Nóbrega, F., Bonifacio, L., Mota, M., Bragança, H., Sousa, E., Inacio, M. L (2022) Nematode-Mycobiota interactions in Pine Wilt Disease. International Symposium IUFRO on Pine Wilt Disease. 22-26.12.2021

Vieira, P. and Gleason, C. (2019). Plant-parasitic nematode effectors - insights into their diversity and new tools for their identification. *Current Opinion in Plant Biology*, 50, 37-43. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.02.007>.

Zhou, L., Li, M., Cui, P., Tian, M., Xu, Y., Zheng, X., Zhang, Z., Li, G. and Wang, X. (2022). Arrestin-Coding Genes Regulate Endocytosis, Sporulation, Pathogenicity, and Stress Resistance in *Arthrobotrys oligospora*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 12, 754333. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.754333>.

Anexos

Anexo A – Alinhamento de seqüências

```

Predito          ATGGTGATAAGGGTCTGTGTAATTGGAGCGGGGGTGAAGCGGCT---GCCCTCGATCAAG
Seqüênciação    -----GGCGGGGGGGGAAGCTGGATCAAACCTCATATCTAAT
                * * * * *
Predito          GCTTGT-GTCGAAGAGGGC--CTAGATGTAGTT--TGTTACGAACGGACTTCAGATATTG
Seqüênciação    TCTTATTAGCGAATAGTACNATAATATGTAGGTCNTGTTACAAACGGACTTCATATATTG
                * * * * *
Predito          GGGGCTCTGGAATTATCGGCCAGATCTACCCAGTGAAGTCCTTTAACGTCAATCAAT
Seqüênciação    GAGGCTCTGGAATTATCGGCAGATCTACCCAGTGAAGTCCTTTAACGTCAATCAAT
                * * * * *
Predito          GAAAAATAGTATAGTATGACTTACGCTAAATTTTAGSATGGAAGTACGGTAATGAAGT
Seqüênciação    GAAAAATAGTATAGTATGACTTACGCTAAATTTTAGSATGGAAGTACGGTAATGAAGT
                * * * * *
Predito          CTACAGTGGTCAACACGTCGAAGGAGATGATGCTACTCGATTCCACCTCCGGAAG
Seqüênciação    CTACAGTGGTCAACACGTCGAAGGAGATGATGCTACTCGATTCCACCTCCGGAAG
                * * * * *
Predito          ATTATCCCAACTCATGCATCACAGTTAGTCATGGATTATTATAGAGATTACGCAGCAA
Seqüênciação    ATTATCCCAACTCATGCATCACAGTTAGTCATGGATTATTATAGAGATTACGCAGCAA
                * * * * *
Predito          AGTTTGATCTTCAAATATATTAATCAATACGGATGGAACAGGTCTATCGGAATA
Seqüênciação    AGTTTGATCTTCAAATATATTAATCAATACGGATGGAACAGGTCTATCGGAATA
                * * * * *
Predito          CAAGTGGAAAAGATTGGACAGTGAACGCGAACGGAGGCAAGGAATTGTTGATAGGT
Seqüênciação    CAAGTGGAAAAGATTGGACAGTGAACGCGAACGGAGGCAAGGAATTGTTGATAGGT
                * * * * *
Predito          TGATGCTGTGCACCGGACATCATTGATCCCCAATATCCTCAATTTAAGGTAATTTA
Seqüênciação    TGATGCTGTGCACCGGACATCATTGATCCCCAATATCCTCAATTTAAGGTAATTTA
                * * * * *
Predito          ATCTGCTCACACTTAATAGAGATATCGAATTAATTTCTAGATCAAAACAGTCAAAGG
Seqüênciação    ATCTGCTCACACTTAATAGAGATATCGAATTAATTTCTAGATCAAAACAGTCAAAGG
                * * * * *
Predito          CCGAATTATTCATGCCAAGAGTACCGGACTCAAAGGATTCGAAGTAAAAATGTTTT
Seqüênciação    CCGAATTATTCATGCCAAGAGTACCGGACTCAAAGGATTCGAAGTAAAAATGTTTT
                * * * * *
Predito          CTTGGTGGGAATCGGAACTCAGCCTTGATATAGCTGTTGAATTGGCAAAGTCGCCAA
Seqüênciação    CTTGGTGGGAATCGGAACTCAGCCTTGATATAGCTGTTGAATTGGCAAAGTCGCCAA
                * * * * *
Predito          GAAAGTTACGATCTCAACTCGTGGGGATCCTGGATTTCAATCGAGTTGGCAAAGCCGG
Seqüênciação    GAAAGTTACGATCTCAACTCGTGGGGATCCTGGATTTCAATCGAGTTGGCAAAGCCGG
                * * * * *
Predito          TATGCCCTATGACGTGGTCTTCCAAGTCGGCTGTATTACTGGCTGATGAACATTCTCCC
Seqüênciação    TATGCCCTATGACGTGGTCTTCCAAGTCGGCTGTATTACTGGCTGATGAACATTCTCCC
                * * * * *
Predito          ATGGAGTGTGGCAATGATTTATGGAGCATCGACTACAAACAGGATGGATCATGATTT
Seqüênciação    ATGGAGTGTGGCAATGATTTATGGAGCATCGACTACAAACAGGATGGATCATGATTT
                * * * * *
Predito          GTATGGCTCAGGCCGECCTCATCGCTTCTCCAGCAACATCCAACGTCAACGATTCCTT
Seqüênciação    GTATGGCTCAGGCCGECCTCATCGCTTCTCCAGCAACATCCAACGTCAACGATTCCTT
                * * * * *
Predito          GGCAATATGTTATGCAAGTGGATGATTACGTAACGTGAAGCACTGATTGCAATATCTA
Seqüênciação    GGCAATATGTTATGCAAGTGGATGATTACGTAACGTGAAGCACTGATTGCAATATCTA
                * * * * *
Predito          TTTTATGATGATTAGGAGGATGAGA-GTCGTTTGAAGCCAATGGGG-TGATCGTGA
Seqüênciação    TTTTATGATGATTAGGAGGATGAGA-GTCGTTTGAAGCCAATGGGG-TGATCGTGA
                * * * * *
Predito          GAACGGGAAGAGATTTGATGCGGATATATATTTGACCGGGTACACATTCGGGTT
Seqüênciação    GAACGGGAAGAGATTTGATGCGGATATATATTTGACCGGGTACACATTCGGGTT
                * * * * *
Predito          TCCTTATCTGACCCCAAAAACATGATCCAGTCAATGTGAGTACTGTAGATTTTTTAA
Seqüênciação    TCCTTATCTGACCCCAAAAACATGATCCAGTCAATGTGAGTACTGTAGATTTTTTAA
                * * * * *
Predito          AAAGTTCCAGGATCATGAAGTCGATCTTACAAGTTTGTTCCTCCAAATGCTGCTG
Seqüênciação    AAAGTTCCAGGATCATGAAGTCGATCTTACAAGTTTGTTCCTCCAAATGCTGCTG
                * * *

```

Figura suplementar A 15 - Alinhamento entre as sequências obtidas pela sequenciação direta de Sanger e as sequências inicialmente previstas para o gene BXY_0386800. Através do *software Clustal W Multiple alignment v. 2.1*.

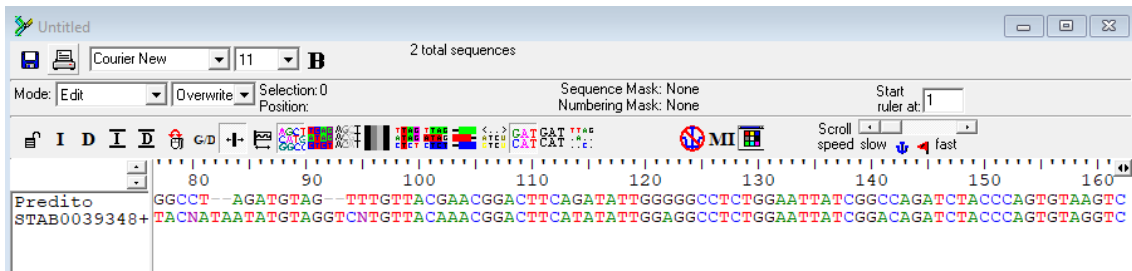


Figura suplementar A.16 - Edição e alinhamento entre as sequencias obtidas pela sequenciação direta de Sanger e as sequencias inicialmente previstas para o gene BXY_0386800. Através do *software BioEdit v.7.2*.

Anexo B – Análise Estatística

Tabela B.4 - Análise de variância ANOVA para as três condições (controle, DMSO e BZ) do gene BXY_0386800, pelo teste Post-Hoc de Tukey, através do *software jamovi v.2.3.28*.

Testes Post Hoc

BXY0386800

Comparações Post Hoc - A

Comparação		Diferença Média	Erro-padrão	gl	t	Ptukey
A	A					
Controlo	- DMSO	0.6050	0.118	3.00	5.107	0.029
	- BZ	0.5650	0.118	3.00	4.769	0.035
DMSO	- BZ	-0.0400	0.118	3.00	-0.338	0.940

Nota. Comparações baseadas nas médias marginais estimadas

Tabela B.5 - Análise de variância ANOVA para as três condições (controle, DMSO e BZ) do gene BXY_1351100, pelo teste Post-Hoc de Tukey, através do *software jamovi v.2.3.28*.

Testes Post Hoc

BXY1351100

Comparações Post Hoc - A

Comparação		Diferença Média	Erro-padrão	gl	t	Ptukey
A	A					
Controlo	- DMSO	-0.600	0.510	6.00	-1.18	0.508
	- BZ	-37.063	0.510	6.00	-72.65	< .001
DMSO	- BZ	-36.463	0.510	6.00	-71.47	< .001

Nota. Comparações baseadas nas médias marginais estimadas

Tabela B.6 - Análise de variância ANOVA para as três condições (controle, DMSO e BZ) do gene BXY_1351100, pelo teste Post-Hoc de Tukey, através do *software jamovi v.2.3.28*.

Testes Post Hoc

BXY0066100

Comparações Post Hoc - A

Comparação		Diferença Média	Erro-padrão	gl	t	Ptukey
A	A					
Controlo	- DMSO	0.2650	0.170	3.00	1.561	0.384
	- BZ	0.0950	0.170	3.00	0.559	0.849
DMSO	- BZ	-0.1700	0.170	3.00	-1.001	0.625

Nota. Comparações baseadas nas médias marginais estimadas

Tabela B.7 - Análise de variância ANOVA para as três condições (controle, DMSO e BZ) do gene BXY_0628900, pelo teste Post-Hoc de Tukey, através do *software jamovi v.2.3.28*.

Testes Post Hoc

BXY0628900

Comparações Post Hoc - A

Comparação		Diferença Média	Erro-padrão	gl	t	Ptukey
A	A					
Controlo	- DMSO	0.307	0.122	6.00	2.52	0.100
	- BZ	-0.287	0.122	6.00	-2.35	0.123
DMSO	- BZ	-0.593	0.122	6.00	-4.87	0.007

Nota. Comparações baseadas nas médias marginais estimadas

Tabela B.8 - Análise de variância ANOVA para as três condições (controle, DMSO e BZ) do gene BXY_1091400, pelo teste Post-Hoc de Tukey, através do *software jamovi v.2.3.28*

Testes Post Hoc

BXY1091400

Comparações Post Hoc - A

Comparação		Diferença Média	Erro-padrão	gl	t	Ptukey
A	A					
Controlo	- DMSO	0.250	0.153	6.00	1.64	0.302
	- BZ	-1.750	0.153	6.00	-11.46	< .001
DMSO	- BZ	-2.000	0.153	6.00	-13.09	< .001

Nota. Comparações baseadas nas médias marginais estimadas

Tabela B.9 - Análise de variância ANOVA para as três condições (controle, DMSO e BZ) do gene BXY_0119000, pelo teste Post-Hoc de Tukey, através do *software jamovi v.2.3.28*

Testes Post Hoc

BXY0119000

Comparações Post Hoc - A

Comparação		Diferença Média	Erro-padrão	gl	t	Ptukey
A	A					
Controlo	- DMSO	0.730	0.368	3.00	1.99	0.262
	- BZ	-3.060	0.368	3.00	-8.33	0.007
DMSO	- BZ	-3.790	0.368	3.00	-10.31	0.004

Nota. Comparações baseadas nas médias marginais estimadas

Tabela B.10 - Análise de variância ANOVA para as três condições (controle, DMSO e BZ) do gene BXY_1655900, pelo teste Post-Hoc de Tukey, através do *software jamovi v.2.3.28*

Testes Post Hoc

BXY1655900

Comparações Post Hoc - A

Comparações		Diferença Média	Erro-padrão	gl	t	Ptukey
A	A					
Controle	- DMSO	0.327	0.186	6.00	1.75	0.262
	- BZ	0.517	0.186	6.00	2.77	0.072
DMSO	- BZ	0.190	0.186	6.00	1.02	0.592

Nota. Comparações baseadas nas médias marginais estimadas