



Escola de Ciências e Tecnologias

Departamento de Química

Curso de Licenciatura em Bioquímica

Validação, por PCR quantitativo, da expressão relativa de genes no nemátoide da madeira do pinheiro (NMP) em resposta ao silenciamento de proteínas *zinc finger*.

Relatório de estágio

Realizado por: Eduarda Tognetti Rodrigues

Orientadoras: Doutora Isabel Velada

Doutora Margarida Espada

Évora

2025



Escola de Ciências e Tecnologias

Departamento de Química

Curso de Licenciatura em Bioquímica

Validação, por PCR quantitativo, da expressão relativa de genes no nemátoide da madeira do pinheiro (NMP) em resposta ao silenciamento de proteínas *zinc finger*.

Relatório de estágio

Realizado por: Eduarda Tognetti Rodrigues

Orientadoras: Doutora Isabel Velada

Doutora Margarida Espada

Évora

2025

“Este trabalho não inclui as observações do júri

Agradecimentos

Expresso a minha profunda gratidão à Universidade de Évora pela sólida preparação académica, teórica e prática que me proporcionou. Essa base foi essencial para que eu pudesse encarar este estágio com o profissionalismo e o sentido de responsabilidade necessários. Agradeço igualmente à instituição pela valiosa oportunidade de realização deste estágio.

Um agradecimento muito especial à Doutora Isabel Velada e à Doutora Margarida Espada. O vosso incentivo constante, apoio incondicional e a ajuda preciosa durante a redação deste relatório foram cruciais. Agradeço, em particular, pela vossa inesgotável disponibilidade e empenho em esclarecer as minhas dúvidas e em me guiar para a melhoria contínua. As vossas orientações foram, sem dúvida, um pilar fundamental ao longo de todo o estágio.

Obrigada a todos pela confiança depositada e pela paciência na partilha de conhecimentos. Isso não só contribuiu significativamente para o meu desenvolvimento técnico e profissional, mas, acima de tudo, para o meu crescimento pessoal. Tudo o que me ensinaram deixou uma marca profunda e duradoura no meu percurso académico.

Por último, mas não menos importante, a todas as pessoas fora do âmbito direto deste relatório, em particular à minha família e amigos, o meu sincero obrigado. O vosso acompanhamento, o interesse genuíno por esta fase da minha vida e a vossa disponibilidade para me auxiliar em qualquer momento, partilhando tanto as frustrações quanto as alegrias do estágio, foram um pilar fundamental.

A todos vocês, a minha imensa gratidão!

Resumo

As proteínas *zinc finger* estão entre as proteínas mais abundantes nos genomas eucarióticos. Muitas destas proteínas são fatores de transcrição (FT) que reconhecem e ligam-se a sequências específicas do DNA, exercendo uma função da regulação da expressão genética. Estudos anteriores de RNAseq revelaram uma expressão elevada destes FT durante a infecção da planta com o nemátode fitoparasita *Bursaphelenchus xylophilus* (causador da doença da murchidão do pinheiro). A expressão destes FT foi silenciada no nemátode e pretende-se agora com esta proposta de estágio validar a expressão de genes que se prevê diminuída como consequência do silenciamento dos FT. Pretende-se igualmente identificar as vias metabólicas nas quais estes genes participam. As técnicas laboratoriais a realizar incluem: isolamento de DNA, PCR convencional, eletroforese em gel de agarose, síntese de cDNA, PCR quantitativo (real time PCR). A análise da expressão relativa por RT-qPCR demonstrou uma redução significativa na expressão dos genes BXY262000 e BXY47000, com diminuições de aproximadamente 35 e 14 vezes, respetivamente, após o silenciamento do fator de transcrição. Estes resultados indicam que ambos os genes podem ser regulados positivamente pelo *zinc finger* C2H2.

Palavras-chave

Bursaphelenchus xylophilus, doença da murchidão madeira do pinheiro, genes de parasitismo, fatores de transcrição, *Zinc fingers*

Abstract

Zinc finger proteins are among the most abundant proteins in eukaryotic genomes. Many of these proteins are transcription factors (TF) that recognize and bind to specific DNA sequences, playing a role in regulating gene expression. Previous RNAseq studies revealed high expression of these TFs during plant infection with the plant-parasitic nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (which causes pine wilt disease). The expression of these TFs was silenced in the nematode and this internship proposal now aims to validate the gene expression that is predicted to be decreased as a consequence of the silencing of TFs. It is also intended to identify the metabolic pathways in which these genes participate. The laboratory techniques to be performed include: DNA isolation, conventional PCR, agarose gel electrophoresis, cDNA synthesis, quantitative PCR (real time PCR). Relative gene expression analysis by RT-qPCR revealed a significant reduction in the expression of BXY262000 and BXY47000, with decreases of approximately 35-fold and 14-fold, respectively, following transcription factor silencing. These results suggest that both genes may be positively regulated by the *zinc finger* C2H2 transcription factor.

Keywords

Bursaphelenchus xylophilus, pine wilt disease, parasitism genes, transcription factors, Zinc fingers

Índice

Agradecimentos	I
Resumo.....	II
Palavras-chave	II
Abstract	III
Keywords.....	III
Índice de Figuras.....	VI
Índice de Tabelas	VII
Siglas/Acrónimos/Abreviaturas.....	VIII
1. Problemática	1
2. Estado da Arte	3
2.1. Nemátodes fitoparasitas	3
2.1. O nemátoide da madeira do pinheiro	4
2.1.1. Biologia do NMP	4
2.1.2. Interações do NMP com o hospedeiro	5
2.1.3. Proteínas do parasitismo	6
2.2. Regulação Genética e Fatores de Transcrição.....	6
2.2.1. Reguladores da expressão génica nos nemátodes fitoparasitas.....	6
2.2.2. Fatores de Transcrição <i>Zinc Fingers</i>	7
3. Objetivos do trabalho.....	10
4. Metodologia	11
4.1. Estratégia.....	11
4.2. Parâmetros analisados:.....	11
4.3. Técnicas utilizadas:	11
4.4. Equipamentos:.....	11
4.5. Reagentes:.....	12
5. Procedimento experimental	13
5.1. Organismo em estudo	13
5.2. Extração de DNA genómico de <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	13
5.3. Quantificação do DNA genómico	14
5.3.1. Quantificação por Qubit.....	14
5.3.2. Quantificação por NanoDrop	15
5.4. Análise preditiva dos genes candidatos de <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	15
5.5. Desenho dos <i>primers</i> para PCR e RT-qPCR	16
5.6. Validação dos genes candidatos por PCR	20

5.7.	Eletroforese em gel de agarose	21
5.8.	Síntese do cDNA	21
5.9.	Quantificação da expressão relativa dos genes por RT-qPCR.....	22
5.10.	Diagrama do trabalho experimental	24
6.	Resultados e Discussão	25
6.1.	Quantificação do DNA	25
6.1.1.	Quantificação por fluorimetria	25
6.1.2.	Quantificação por espectrofotometria (NanoDrop)	25
6.2.	Análise preditiva dos genes candidatos	26
6.3.	Validação dos genes candidatos	28
7.	Conclusões	35
8.	Referências Bibliográficas	37
A.	Anexos	41
	Domínios do gene BXYJ5.060046200	41
	Domínios do gene BXYJ5.050262000	42
	Domínios do gene BXYJ5.040018300	43
	Domínios do gene BXYJ5.010047000	44

Índice de Figuras

Figura 1- Doença da murchidão do pinheiro que afeta o pinheiro-bravo (<i>Pinus pinaster</i>), na autoestrada A6 (cortesia de Prof. Manuel Mota).	1
Figura 2- Modos distintos de parasitismo em nemátodes fitoparasitas incluem ectoparasitas e endoparasitas migratórios, bem como endoparasitas sedentários.	3
Figura 3- Ciclo de vida do nemátoide do pinheiro, <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> , que causa a doença da murchidão do pinheiro.	4
Figura 4- Esquema representativo da estrutura do nemátoide parasita e a sua interação com as células-alvo da planta.	5
Figura 5- Representação das estruturas das diferentes famílias de <i>zinc fingers</i>	7
Figura 6- Representação da distribuição de 37 famílias entre os vários grupos de eucariotas.	8
Figura 7- Diagrama ilustrativo do trabalho experimental.	24
Figura 8- Gel de agarose com os fragmentos de DNA amplificados.	28
Figura 9- Curva de amplificação.	30
Figura 10- Melting curve do gene BXYJ5.010047000.	31
Figura 11- Melting curve do gene BXYJ5.050262000.	31
Figura 12- Expressão relativa dos genes BXYJ5.050262000 nas condições de controlo e tratamento.	33
Figura 13- Expressão relativa dos genes BXYJ5.010047000 nas condições de controlo e tratamento.	33
Figura 14- Domínios funcionais do gene BXYJ5.060046200.	41
Figura 15- Domínios funcionais do gene BXYJ5.050262000.	42
Figura 16- Domínios funcionais do gene BXYJ5.040018300.	43
Figura 17- Domínios funcionais do gene BXYJ5.010275000.	43
Figura 18- Domínios funcionais do gene BXYJ5.010047000.	44

Índice de Tabelas

Tabela 1- Lista dos primers utilizados em todo o procedimento experimental. F- forward; R- reverse.....	17
Tabela 2- Primers desenhados para a técnica de RT-qPCR.	19
Tabela 3- Quantificação das amostras por fluorimetria.....	25
Tabela 4-Quantificação por NanoDrop.	25
Tabela 5- Resultados da análise preditiva realizada para os genes de parasitismo em estudo.....	27
Tabela 6- Análise da expressão relativa pelo método de <i>Livak</i>	32
Tabela 7- Interpretação da expressão relativa dos genes	34

Siglas/Acrónimos/Abreviaturas

BXY	Bursaphelechus xylophilus
BP	[do inglês <i>Base Pairs</i>] – Pares de base
cDNA	[do inglês <i>complementary DNA</i>] - DNA complementar
Cq	[do inglês <i>quantification cycle</i>] – Ciclo de quantificação
DEPC- treated H ₂ O	[do inglês <i>Diethylpyrocarbonate treated H₂O</i>] - Água tratada com dietilpirocarbonato
DMP	Doença da Murchidão do Pinheiro
DNA	[do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>] - Ácido desoxirribonucleico
FT	Fator de Transcrição
gDNA	DNA genómico
kDa	[do inglês <i>kilodaltons</i>] - Quilodalton
NFW	[do inglês <i>Nuclease Free Water</i>] - Água livre de nucleases
NMP	Nemátode da Madeira do Pinheiro
NPP	Nemátodes Parasitas de Plantas
PCR	[do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>] - Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	[do inglês <i>Ribonucleic acid</i>] - Ácido Ribonucleico
RT-qPCR	[do inglês <i>Reverse Transcription quantitative PCR</i>] – Transcrição Reversa seguida de PCR quantitativa
SHKT	[do inglês <i>Stichodactyla elianthus Potassium channel Toxin</i>] - Toxina do canal de potássio de <i>Stichodactyla helianthus</i>
SQRTPCR	Semi-Quantitativo RT-PCR
TBE	Tris-Boric-EDTA
TLP	[do inglês <i>Transthyretin like proteins</i>] - Proteínas semelhantes à Transtirretina
TTR	[do inglês <i>Transthyretin</i>] - Transtirretina
UV	Ultra-Violeta
V	Volts

1. Problemática

A doença da murchidão do pinheiro, representada na Figura 1, causada pelo nemátode da madeira do pinheiro (NMP), *Bursaphelenchus xylophilus*, representa uma grave ameaça às florestas de coníferas em todo o mundo [1], representando um enorme impacto negativo para os ecossistemas florestais [2]. O NMP foi descrito pela primeira vez na Europa, em Portugal no ano de 1999, onde tem contribuído para o declínio da floresta de pinheiro-bravo (*Pinus pinaster*), distribuído pelo sul e centro do País e Ilha da Madeira [3–5] e em Espanha [6]. A doença tem graves consequências económicas e ecológicas na indústria da madeira e nas florestas de coníferas [4]. O NMP foi incluído na lista A2 dos organismos de quarentena da União Europeia, de acordo com a Diretiva 77/93/EEC (EPPO, 2018) [7], e no caso de existir a deteção positiva do nemátode será aplicada a restrição na importação de produtos de madeira, agravados por possíveis sanções e restrições comerciais impostas à exportação de produtos florestais de países afetados.



Figura 1- Doença da murchidão do pinheiro que afeta o pinheiro-bravo (*Pinus pinaster*), na autoestrada A6 (cortesia de Prof. Manuel Mota).

A dispersão deste fitoparasita para outros países da Europa é uma ameaça constante devido a presença de planta hospedeiras suscetíveis e às alterações climáticas, como a seca e o aumento das temperaturas podendo impactos significativos nas florestas de coníferas [1]. Em Portugal, foram implementadas medidas de controlo e gestão das áreas infetadas, tais como, a erradicação de árvores infetadas e a monitorização do

inseto vetor. Estes meios de controlo e a realização de medidas fitossanitárias não são suficientes para o controlo da doença [8].

Dada a gravidade da situação, é essencial aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos moleculares de patogenicidade que tornam o *Bursaphelenchus xylophilus* tão eficaz na infecção das plantas hospedeiras. Investir em estratégias de controlo inovadoras pode prevenir a expansão da doença para outros países europeus, minimizar o impacto económico e ecológico em Portugal e na Europa, bem como reduzir os custos e restrições associados às sanções comerciais.

Em Portugal, o controlo do NMP é essencial para proteger as florestas de pinheiros, que desempenham um papel crucial no equilíbrio ecológico e na economia nacional. A investigação e a aplicação de estratégias inovadoras de controlo são indispensáveis para mitigar os impactos e prevenir a disseminação deste organismo para outras regiões.

2. Estado da Arte

2.1. Nemátodes fitoparasitas

Os nemátodes parasitas de plantas (NPP) infetam plantas agrícolas e florestais de grande importância económica e ecológica. Possuem uma estrutura alongada e cilíndrica com sistema digestivo, reprodutor e nervoso que lhes permite serem bem-sucedidos como parasita na planta hospedeira [9]. Pelos danos significativos que causam na agricultura e florestas, ameaçam a sustentabilidade das culturas e produção agrícola e florestal ao nível mundial, representando perdas anuais de colheitas estimadas em cerca de 80 mil milhões de dólares [10].

De acordo com a sua estratégia de parasitismo, os NPP são divididos em três grandes grupos: ectoparasitas, semi-endoparasitas e endoparasitas, tal como mostra na Figura 2 [11,12]:

- Ectoparasitas: passam todo o ciclo de vida fora do hospedeiro, utilizando apenas um estilete rígido para se alimentar;
- Semi-endoparasitas: penetram parcialmente nas raízes para se alimentar, mantendo parte do corpo no solo;
- Endoparasitas: invadem completamente as raízes e alimentam-se dos tecidos internos.

Os endoparasitas subdividem-se em dois grupos: migratórios e sedentários. Os migratórios, como *Pratylenchus* spp. e *Radopholus* spp., movem-se através dos tecidos das raízes, danificando-as. Os sedentários, como os nemátodes-das-galhas (*Meloidogyne* spp.) e os nemátodes-dos-quistas (*Globodera* e *Heterodera*), estabelecem-se em células específicas e induzem a formação de células gigantes para alimentação. Estes dois últimos são considerados os NMPs mais devastadores globalmente [10].

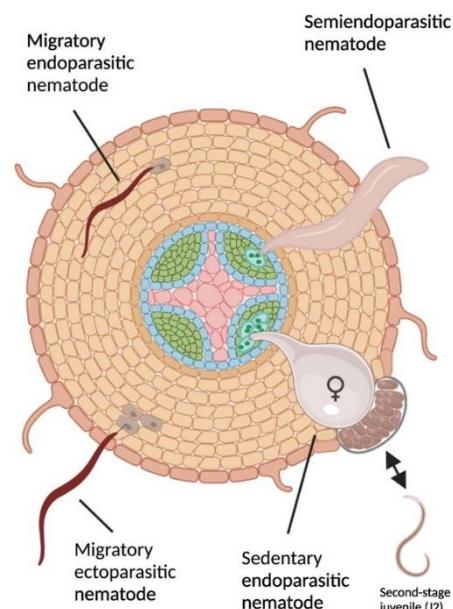


Figura 2- Modos distintos de parasitismo em nemátodes fitoparasitas incluem ectoparasitas e endoparasitas migratórios, bem como endoparasitas sedentários (adaptado de Topalovic e Vestergard, 2021).

2.1. O nemátoide da madeira do pinheiro

2.1.1. Biologia do NMP

Entre eles, o *Bursaphelenchus xylophilus*, nemátoide da madeira do pinheiro (NMP), destaca-se como um dos dez NPPs com maior impacto económico e importância científica [10]. Este endoparasita migratório 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* [4].

O NMP apresenta duas fases distintas no seu ciclo de vida, uma fase fitófaga (parasítica) onde se alimenta das células da planta e uma outra fase micetófaga, em que se alimenta de fungos na árvore afetada (Figura 3). Esta característica permite a sobrevivência do nemátoide quando a planta já está em declínio e a comunidade fúngica é mais elevada [13].

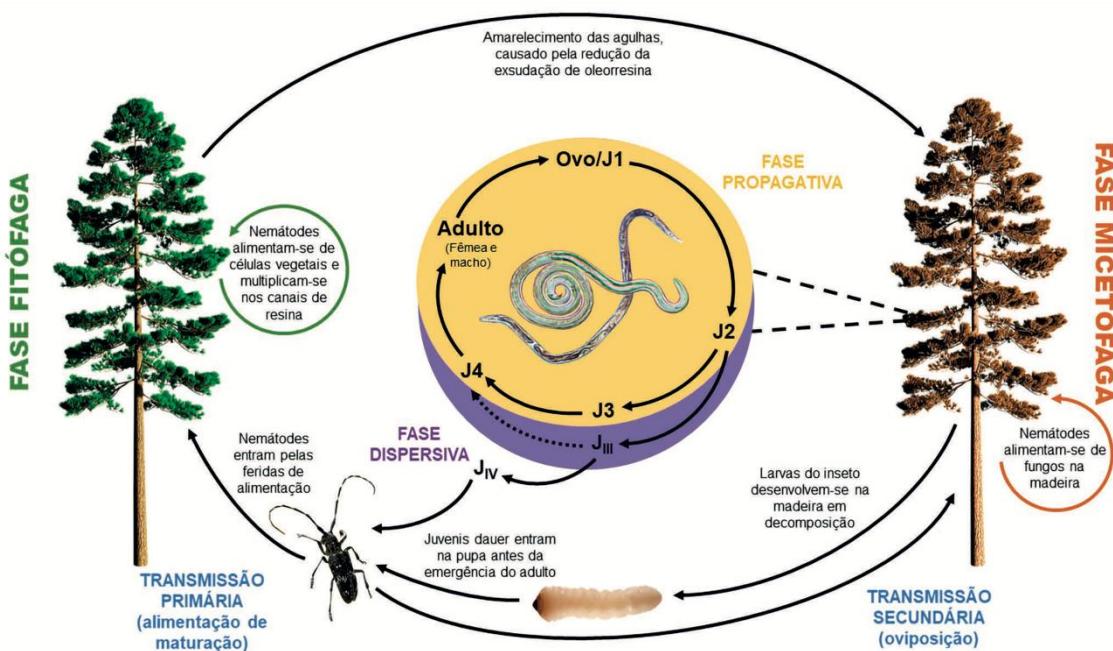


Figura 3- Ciclo de vida do nemátoide do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*, que causa a doença da murchidão do pinheiro (adaptado de Pires et al., 2022).

2.1.2. Interações do NMP com o hospedeiro

Durante a fase fitófaga, as interações entre o NMP e o hospedeiro são mediadas por proteínas de parasitismo, que desenvolvem um papel durante a infecção e contribuem para o sucesso do nemátode. Esta interação complexa com a planta hospedeira, envolve estruturas celulares específicas, tal como se pode observar na Figura 4 [14], as glândulas esofágicas (duas glândulas subventrais e uma glândula dorsal).

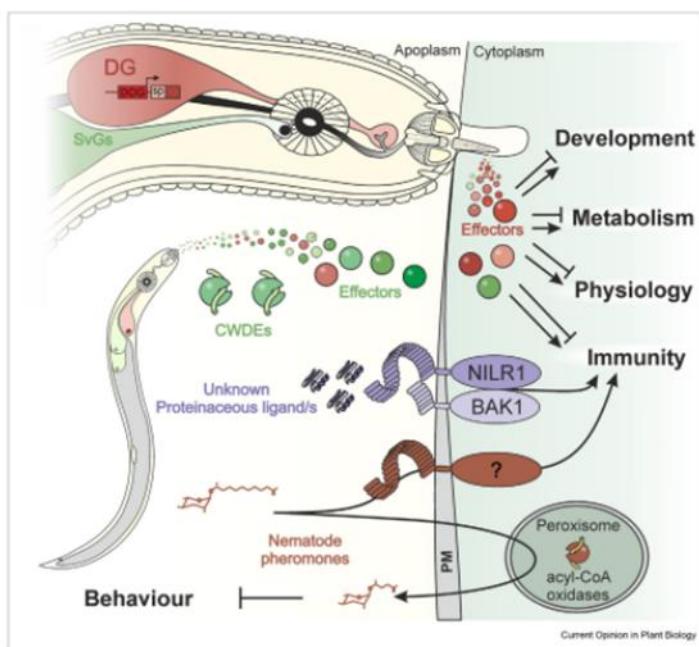


Figura 4- Esquema representativo da estrutura do nemátode parasita e a sua interação com as células-alvo da planta. Estão representadas estruturas celulares importantes no parasitismo e seu mecanismo de ação [14].

Os nemátodes utilizam o estilete, uma estrutura rígida e oca, para perfurar as células da planta hospedeira, secretar proteínas de parasitismo e alimentar-se do conteúdo celular [14]. As proteínas de parasitismo têm diferentes funções durante a infecção: degradação celular, migração nos tecidos das plantas, digestão dos conteúdos citoplasmáticos, defesa do nemátode e suprimir ou manipular as defesas do hospedeiro [15]. Durante esse processo, causam danos nas paredes celulares e tecidos vegetais, comprometendo a funcionalidade das raízes (reduzindo a eficiência na absorção de água e nutrientes essenciais), caules e folhas [10].

No caso do NMP, o nemátode migra pelo caule da árvore através das células do córtex e dos canais resiníferos, promove o bloqueio do transporte de água e minerais no xilema e floema causando o rápido colapso hidráulico da árvore. Estudos anteriores mostram que o nemátode secreta enzimas como celulases e pectidases que degradam

componentes da parede celular, facilitando a penetração e migração nos tecidos, produzidas pelas glândulas esofágicas [1,13].

A grande maioria das proteínas de parasitismo dos NPP são expressas nas glândulas esofágicas [3]. No caso do NMP, em estudos anteriores de transcriptómica foram identificados vários genes potencialmente expressos pelas glândulas esofágicas e que participam no parasitismo [16]. Adicionalmente identificaram-se alguns fatores de transcrição que estão expressos apenas nas glândulas esofágicas e que têm a sua expressão aumentada em contacto com o hospedeiro.

2.1.3. Proteínas do parasitismo

O sucesso do parasitismo do NMP depende de uma série de proteínas secretadas que interagem diretamente com a planta hospedeira, desempenhando funções específicas para facilitar a infecção.

Os efetores secretados pelas glândulas esofágicas modulam as células da planta hospedeira. Eles são transportados através do estilete e inseridos diretamente nas células do hospedeiro, algumas das proteínas secretadas pelo NPM são expansivas, com função de enfraquecer a parede celular da planta de modo a facilitar a penetração e a migração do nemátoide. Celulases, pectinases e xilanases têm como função degradar a parede celular, permitindo a penetração e disseminação do nemátoide através dos tecidos da planta [17]. Outras têm função de modular a resposta de defesa da planta, suprimindo mecanismos de defesa ou alterando a fisiologia celular e permitindo a colonização [18]. Alguns efetores secretados não possuem similaridades com nenhuma proteína conhecida e não se sabe a sua função (“novas proteínas”) e podem desempenhar papéis únicos no parasitismo [1].

2.2. Regulação Genética e Fatores de Transcrição

2.2.1. Reguladores da expressão génica nos nemátodes fitoparasitas

A expressão de genes envolvidos no parasitismo pode ser regulada por moléculas que podem modelar a produção das proteínas de parasitismo. Entre esses reguladores de expressão génica, destacam-se os fatores de transcrição (FT), comum nos eucariontes. No NPP, nemátoide dos quistos (*Heterodera spp.*), foi encontrado uma molécula que regula a transcrição de genes envolvidos no parasitismo [19]. O silenciamento do elemento regulador de expressão SUGR1 bloqueia a expressão de genes importantes no parasitismo do nemátoide dos quistos [20].

2.2.2. Fatores de Transcrição Zinc Fingers

Os fatores *zinc finger* são proteínas reguladoras que se ligam ao DNA por meio de domínios ricos em zinco, modulando a expressão de genes-alvo, regulam a expressão de genes codificadores de enzimas de degradação da parede celular e proteínas de parasitismo facilitando a adaptação metabólica do nemátoide ao ambiente da planta hospedeira, garantindo sua sobrevivência [21].

As proteínas *zinc finger* (*ZFPs*) constituem uma das maiores e mais diversificadas famílias de fatores de transcrição nos eucariotas [22]. Caracterizam-se por conter domínios estruturais que coordenam iões de zinco, permitindo a ligação específica ao DNA e, consequentemente, a regulação da expressão genética. Essas proteínas desempenham papéis cruciais em diversos processos biológicos, incluindo desenvolvimento, regulação da transcrição, remodelação da cromatina e diferenciação celular e resposta a estímulos ambientais, entre outros [23,24].

As *ZFPs* são classificadas em nove subfamílias com base na organização dos resíduos de cisteína (C) e histidina (H) dentro dos motivos *Zn*, podemos ver uma representação destas proteínas na Figura 5, estas incluem C2H2, CCCH, C3HC4 (RING), C2HC5, C4HC3 (PHD), C2HC, C4, C6 e C8 [22].

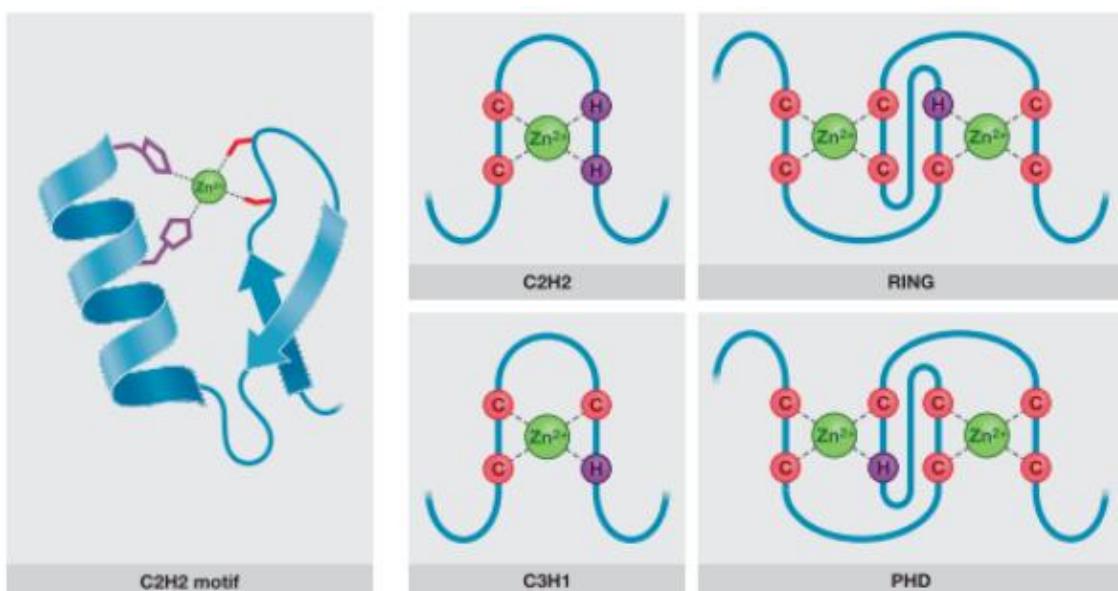


Figura 5- Representação das estruturas das diferentes famílias de *zinc fingers*. Adaptado de [22].

A família C2H2 de ZFPs é amplamente distribuída entre os eucariotas, como podemos ver pela Figura 6. Análises filogenéticas revelaram a presença de 37 famílias bem conservadas de genes ZNF-C2H2-em 124 espécies eucarióticas, abrangendo desde protistas até humanos. Essa distribuição sugere que a complexidade e a diversidade dessas proteínas aumentaram progressivamente com a evolução dos organismos eucarióticos [22].

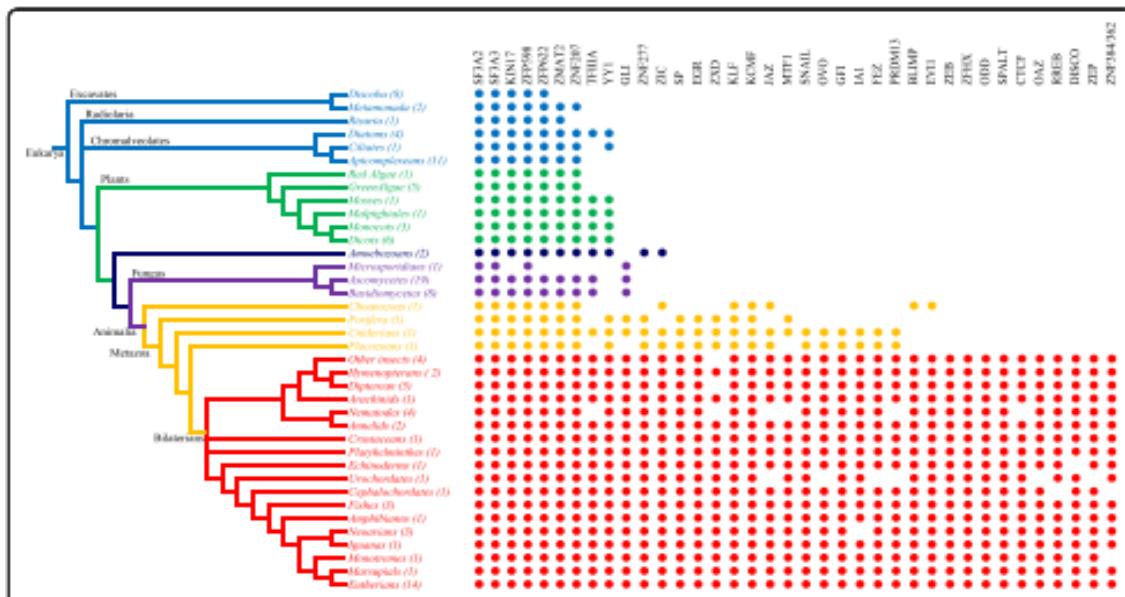


Figura 6- Representação da distribuição de 37 famílias entre os vários grupos de eucariotas. Os números em parenteses indicam o número de espécies em cada filo, as cores indicam os diferentes grupos taxómicos. Adaptado de [22].

Estudos elaborados no nemártode *Caenorhabditis elegans*, (organismo modelo) foram identificados 988 genes de fatores de transcrição, dos quais aproximadamente metade pertence às famílias ZF-C2H2 e ZF-C4/NHR. Essas famílias são notáveis por sua rápida evolução e por eventos de duplicação específicos de linhagem, sugerindo uma adaptação funcional diversificada dentro deste filo [25]. Neste estudo, foi a primeira vez que se fez uma análise extensiva do genoma do FTs em nemátodes, mas também em outros organismos. As descobertas relevam que existe uma conservação substancial de fatores de transcrição, mesmo entre linhas evolutivas distantes e constituem a base para experiências futuras para examinar a função do gene FT em nemátodes e outros filos divergentes [25].

Entre as 37 famílias de genes ZF-C₂H₂, sete famílias (SF3A2, SF3A3, KIN17, ZFP598, ZFP622, ZMAT2 e ZNF207) parecem estar presentes em quase todos os eucariotas [26].

Apesar da importância das proteínas C₂H₂ em diversos organismos, há poucos estudos focados em nemátodes parasitas, especialmente NPP. No entanto, pesquisas

em parasitas humanos filogeneticamente próximos, como *Schistosoma mansoni* (platelminto), e mais distantes, como *Plasmodium falciparum* (protozoário do filo Apicomplexa) e *Trypanosoma cruzi* (protozoário), têm explorado o papel dessas proteínas. Por exemplo, em *P. falciparum*, foram identificadas proteínas com domínios de ZF-PHD, que atuam como reguladores epigenéticos ou modificadores de cromatina, influenciando a regulação génica durante o ciclo de vida do parasita [22].

No platelminto *Schistosoma mansoni*, proteínas da família C2H2, como ZFP-1 e ZFP-1-1, desempenham papéis cruciais na especificação de células progenitoras do tegumento, essenciais para o desenvolvimento e manutenção deste parasita.

A ausência de estudos sobre proteínas ZF C2H2 em nemátodes parasitas, especialmente NPP, representa uma lacuna no conhecimento atual. Investigações futuras poderiam elucidar o papel dessas proteínas na biologia dos parasitas e identificar potenciais alvos para estratégias de controlo.

3. Objetivos do trabalho

Este trabalho tem como objetivo analisar os mecanismos moleculares que estão na base da interação entre o NMP, *Bursaphelenchus xylophilus*, e a sua planta hospedeira. A interação envolve proteínas de parasitismo que são produzidas em células especializadas no corpo do NMP. O objetivo deste trabalho é compreender o papel de elementos reguladores de expressão génica de proteínas relacionadas com o parasitismo, como os fatores de transcrição *zinc finger*.

Os objetivos específicos do trabalho são:

- Após o silenciamento de um fator de transcrição pertencente à família *zinc finger*, compreender que genes têm a sua expressão potencialmente afetada, *in silico*.
- Validação da expressão relativa dos genes cuja expressão é sob expressa após o silenciamento.
- Caracterizar os genes validados e compreender o envolvimento na interação molecular.

Para cumprir os objetivos deste trabalho serão utilizadas diferentes técnicas de biologia molecular como análise preditiva *in silico*, amplificação por PCR e RT-PCR, eletroforese em gel de agarose, síntese de DNA complementar (cDNA) e RT-qPCR (*reverse transcription quantitative PCR*).

Esta é a principal hipótese deste trabalho de investigação, propor que proteínas C2H2 em nemátodes fitoparasitas regulam genes envolvidos no desenvolvimento, para testar essa hipótese, adotaremos uma abordagem semelhante à de Tavares et al. [27]. Para testar essa hipótese, a expressão de um gene codificante de um ZFC₂H₂ foi silenciada e os nemátodes foram sequenciados por RNA-seq. Este TF tem a sua expressão nas glândulas esofágicas e está mais expresso em contacto com o hospedeiro. Do resultado do transcriptoma é necessário identificarem-se os genes regulados por essas proteínas e é realizada a qRT-PCR para validar os dados da sequenciação.

Essa metodologia permitirá identificar genes regulados por proteínas C2H2 e compreender o seu papel no processo de parasitismo deste nemátode fitoparasita.

4. Metodologia

4.1. Estratégia

Locais de realização: Laboratório de Nematologia (NemaLab) e Unidade de Microscopia, Pólo da Mitra, Universidade de Évora.

Apoio Financeiro: Projeto NemaWAARS (**PTDC/ASP-PLA/1108/2021**)

Duração: 1 semestre letivo.

4.2. Parâmetros analisados:

- Amplificação dos genes em estudo a partir de DNA genómico (gDNA);
- Quantificação da concentração dos ácidos nucleicos (DNA);
- Amplificação dos transcritos dos genes a partir de DNA complementar (cDNA);
- Tamanho dos fragmentos obtidos e análise das suas sequências;
- Análise da expressão dos transcritos dos genes;
- Predição dos domínios funcionais de proteínas e a sua caracterização;
- Análises de sequências.

4.3. Técnicas utilizadas:

- Extração de DNA genómico;
- Quantificação de ácidos nucleicos com fluorómetro;
- Amplificação de fragmentos de DNA por PCR;
- Eletroforese em gel de agarose;
- Síntese da cadeia simples de cDNA;
- Análise preditiva com recurso a softwares *open source*.

4.4. Equipamentos:

- Centrifuga da marca *Scanspeed*, modelo Mini;
- Centrifuga da marca *Hermle*, modelo z 60 M;
- Congelador, marca *Beko*, modelo RFNE312K31WN V 1850X595;
- Fluorómetro da marca *Thermo Fisher Scientific*, modelo *QubitTM 4 Fluorometer*;
- Lupa da marca *Olympus*, modelo SZ61;
- Fonte de alimentação da marca *VWR*, modelo 300V;
- *NanoDrop 2000/2000c Software Installation Guide*, 12V-30VV;
- Rotador multifunções de microtubos, marca *VWR*, modelo tubo rotador;
- Termociclador da marca *BIORAD*, modelo *T100 Thermal Cycler*;
- Termociclador da marca *BIOER*, modelo *GeneExplorer Thermal Cycler*;

- Micropipetas: Modelos de 1000, 2000, 50 e 10 μL e respetivas pontas;
- Transiluminador com sistema de fotodocumentação da marca VWR, modelo GenoView.
- Vortex (VWR INTERNATIONAL);
- Tina de eletroforese 100 mL (BIO-RAD), pente e berço para eletroforese;
- Câmara de fluxo horizontal: Marca- ESCO; Modelo- *Laminar Flow Cabinet*.
- *DNA Mini Spin Column*.

4.5. Reagentes:

- Agarose (NZYtech);
- *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen);
- *Kit de extração NZY Tissue gDNA isolation kit* (NZYtech);
- *Qubit™ dsDNA BR Assay Kit, Thermo Fisher Scientific* (faixa de quantificação: 2-1000 ng);
- *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 Super Script III First-Stand Synthesis System for RT-PCR (*Invitrogen*);
- Soluções tampão para lise celular e precipitação de DNA;
- Soluções de lavagem (tampão AW1 e tampão AE, previamente preparados com álcool);
- *Nuclease Free Water*;
- *Master Mix*.

5. Procedimento experimental

5.1. Organismo em estudo

Nemátode da madeira do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus* de origem portuguesa. O isolado BxREF é inoculado em fungo *Botrytis cinerea* (não-esporulado) previamente crescido em sementes de cevada, onde se multiplica durante 10 dias a 25°C. O isolado é mantido em cultura no Laboratório de Nematologia.

Como já foi referido anteriormente este estudo investigou a função de um fator de transcrição do tipo *zinc finger* na regulação génica. Inicialmente, um gene codificante deste fator de transcrição foi silenciado em amostras experimentais (amostra de tratamento), enquanto outras serviram de controlo (amostras de controlo).

Após 24 horas de incubação, o RNA foi extraído de todas as amostras para realizar uma análise de RNA-seq (*Novogene*). Esta técnica permitiu identificar e quantificar a expressão diferencial de genes, revelando quais genes foram subexpressos, regulados e negativamente ou superexpressos, regulados positivamente, devido ao silenciamento do fator de transcrição, bem como aqueles que mantiveram uma expressão estável. Este trabalho foi previamente realizado no Laboratório de Nematologia.

Para validar os resultados obtidos pelo RNA-seq e confirmar as alterações na expressão de genes-alvo específicos, utilizou-se a técnica de qRT-PCR.

5.2. Extração de DNA genómico de *Bursaphelenchus xylophilus*

A extração de DNA genómico do nemátode foi realizada com o objetivo de isolar material genético a partir de duas amostras biológicas distintas, utilizando o kit comercial *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante, com pequenas adaptações. O processo foi dividido em três etapas principais: lise celular, ligação/precipitação do DNA e lavagem/eluição do material genético.

Na etapa de lise celular, foram adicionados 180 µL de tampão de lise e 20 µL de proteinase K, a cada uma das amostras. A proteinase K tem como sua principal função degradar as enzimas de proteínas, clivando ligações peptídica e atua na digestão de proteínas estruturais das membranas celulares e nucleares, contribuindo para a rutura da célula e libertação do DNA para a solução. a cada uma das amostras. Após homogeneização, as amostras foram incubadas a 56°C, durante 3 horas, esta temperatura é considerada a temperatura ótima para a sua atividade enzimática em muitos protocolos, pois maximiza a sua capacidade de digerir proteínas e previne a

degradação do DNA garantindo que o seu DNA genómico permaneça intacto durante a incubação prolongada, temperaturas muito mais elevadas poderiam começar a danificar o mesmo. A combinação da ação da proteinase K com o aumento da temperatura torna a lise celular mais eficiente, permitindo uma libertação mais completa do DNA do interior das células do nemátoide. As membranas tornam-se mais fluidas e permeáveis, facilitando a ação dos detergentes no tampão de lise.

Em seguida, na fase de ligação e precipitação do DNA, foram adicionados mais 180 μL de tampão de ligação e 200 μL adicionais de etanol absoluto. A mistura foi homogeneizada por vórtex e recebeu etanol absoluto, favorecendo a precipitação dos ácidos nucleicos. Posteriormente, a solução foi transferida para colunas de extração (*DNA Mini Spin Column*) e submetida a centrifugação a 8000 rpm durante 1 minuto, permitindo a ligação do DNA à membrana da coluna.

Por fim, na etapa de lavagem e eluição do DNA, foram realizadas duas lavagens sequenciais: a primeira com 500 μL de tampão AW1 e a segunda com 500 μL de tampão AW2, ambas seguidas de centrifugação a 8000 rpm por 1 minuto. Para a eluição do DNA, foram adicionados 50 μL de tampão AE diretamente na coluna, com posterior incubação à temperatura ambiente (15–25°C) durante 1 minuto. A eluição inicial foi realizada por centrifugação a 12000 rpm durante 2 minutos. No entanto, devido à baixa eficiência observada, realizou-se uma segunda eluição com mais 50 μL de tampão AE, repetindo-se a centrifugação nas mesmas condições.

Este procedimento permitiu a obtenção de DNA com quantidade e qualidade adequadas para as análises subsequentes.

5.3. Quantificação do DNA genómico

5.3.1. Quantificação por Qubit

A quantificação do DNA extraído foi realizada através do *equipamento Qubit™ 4 Fluorometer* (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, nos Estados Unidos*), utilizando o *Qubit™ dsDNA BR Assay Kit*, adequado para detetar concentrações de DNA de dupla cadeia no intervalo de 2 a 1000 ng. Este método baseia-se na emissão de fluorescência de sondas específicas quando se ligam ao DNA, permitindo uma quantificação precisa e seletiva.

O procedimento envolveu três etapas principais: preparação dos padrões, preparação das amostras e leitura das concentrações no fluorómetro.

Na preparação dos tubos-padrão, foram adicionados 190 µL da solução do *Qubit™ dsDNA BR Assay Kit* a dois tubos, aos quais se juntaram 10 µL de cada padrão fornecido pelo kit (Standard 1 e Standard 2), conforme as instruções do fabricante.

Para a preparação das amostras, foram misturados 199 µL do reagente de trabalho com 1 µL de cada uma das amostras de DNA extraído (BXY1 e BXY2), seguidos de homogeneização por vórtex. No entanto, devido a um erro de manuseamento, a amostra BXY2 apresentou um volume inferior ao da BXY1, o que poderá representar um fator de risco na precisão da quantificação desta amostra. Para colmatar este erro, posteriormente foi feita uma diluição com mais 20 µL do tampão AE de forma a obtermos um maior volume de amostra BXY2.

5.3.2. Quantificação por NanoDrop

Optou-se pela realização de um método complementar de quantificação como forma de reforçar os valores obtidos pelo método anterior. O NanoDrop 2000/2000c (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, nos Estados Unidos) mede a concentração com precisão de amostras de DNA purificadas <15.000 ng/µL sem diluição. Antes da leitura da absorbância das amostras de DNA, foi lida primeiro a absorbância da solução tampão (*branco*) no qual o DNA foi eluído, sendo este valor descontado do valores de absorbância das amostras de DNA.

5.4. Análise preditiva dos genes candidatos de *Bursaphelenchus xylophilus*

Neste estudo foram caracterizados cinco genes candidatos de *B. xylophilus*: BXYJ5.050262000, BXYJ5.060046200, BXYJ5.040018300 e BXYJ5.010275000 e BXYJ5.010047000. Estes genes foram identificados no transcriptoma das glândulas esofágicas de *B. xylophilus*, de acordo com a informação prévia (M. Espada) (Anexo 1) [25]. As sequências preditivas do gene, transcrito e proteína estão disponíveis na versão anotada do genoma de *B. xylophilus* (Bio Project PRJEB40022) no site WormBase Parasite (<https://parasite.wormbase.org/species.html>). O software InterPro (https://www.ebi.ac.uk/interpro/_; [28]) foi utilizado para identificar os possíveis domínios das proteínas. Para se fazer a análise de similaridade de sequencia das proteínas codificadas pelos genes candidatos, foi utilizado o software BlastP (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins&PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq..).

5.5. Desenho dos *primers* para PCR e RT-qPCR

O desenho dos *primers* específicos é um fator crucial para a amplificação eficiente de regiões de interesse por PCR.

Os *primers* utilizados para o PCR convencional foram desenhados utilizando a ferramenta *Oligonucleotide Properties Calculator* (disponível em: <https://www.biosyn.com/gizmo/tools/oligo/oligonucleotide%20properties%20calculator.htm>), fazendo uso da cadeia de DNA do gene. Além disso, alguns *primers* foram confirmados com a ferramenta alternativa *Primer3*, garantindo maior robustez nos ensaios de PCR, descritos na Tabela 1.

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

Identificação dos genes	Sequência dos primers (5'-3')	Temperatura de annealing	Tamanho esperado do fragmento (bp)
BXYJ5.060046200 <i>(full length)</i>	Bxy_060046200_FL_F: ATG CCG AAC CAC TGC TTA GAA CCA	57°C	2356
	Bxy_060046200_FL_R: AAT TTA CTA TGC TGC CGT TGC GCG	57°C	
BXYJ5.040018300 <i>(full length)</i>	Bxy_040018300_FL_F: CTG GAT ATT CTT TAT TGT CGT CGG	54°C	1908
	Bxy_040018300_FL_R: ACG CCG CAT GTC TTC TTG CA	54°C	
BXYJ5.050262000 <i>(full length)</i>	Bxy_050262000_FL_F: CCA ATT CGC CAT TAT AAC CTT ACT C	54°C	776
	Bxy_050262000_FL_R: CTT GAT GTC GCT GGT CTT	51°C	
BXYJ5.010275000 <i>(full length)</i>	Bxy_010275000_FL_F: ATG AAG CTG TTT GTA GTG GCT	52°C	1124
	Bxy_010275000_FL_R: TTA TCC GGA GAA GCT GTC CT	56°C	
BXYJ5.010047000 <i>(full length)</i>	Bxy_010047000_FL_F: ATG ATT GCC AAA ACC TTC CTC CT	53°C	542
	Bxy_010047000_FL_R: CTA GTG GAA GCA GAC TCT CTC TT	55°C	

Em relação aos *primers* para a técnica de RT-qPCR estes foram selecionados usando a sequência de cDNA de cada gene através da ferramenta *Primer3Web* (v.4.1.0), O programa [29] e para determinar o a sequência reversa do complementar a ferramenta *Bioinformatics.org*. (<https://primer3.ut.ee/>), descritos na Tabela 2.

Os *primers* foram encomendados à empresa STABVIDA (Portugal) na Universidade Nova de Lisboa. Quando chegam estes encontram-se liofilizados e foi necessário proceder a sua hidratação e suspensão, e posteriormente à preparação da solução *stock* e da solução de trabalho. Para uma melhor compreensão deste processo podemos dar o exemplo do *primer* Bxy_060046200_FL_F: ATG CCG AAC CAC TGC TTA GAA CCA. Este foi submetido a uma centrifugação a 500 rpm durante um minuto para poder depositar todo o conteúdo no fundo do tubo e depois foi adicionado o volume correspondente de água ultra-pura / *nuclease free water* (NFW). No caso das soluções *stock* pretendia-se fazer uma solução 100 μ M (micro molar), para tal adicionou-se 290 μ L (micro litros) de NFW, uma vez que de acordo com a STABVIDA a quantidade oligonucleótidos era de 29,0 nanomoles (nMoles), sendo submetida a uma agitação suave durante 30 min. O mesmo método foi usado para os diferentes *primers* mudando apenas o volume adicionado consoante a informação da quantidade de nanomoles por tubo fornecida pela empresa de sequenciação dos *primers*.

Relativamente às soluções de trabalho foram preparadas para obter um volume de 100 μ L com concentração de 10 μ M (diluição 10x da solução *stock*). Para tal, foi adicionado para um novo microtubo de 1,5 mL, 90 μ L de NFW e 10 μ L de solução *stock*.

Tabela 2- Primers desenhados para a técnica de RT-qPCR.

Identificação dos genes	Primers qPCR(5'-3')	Tm primer (F/R) (°C) – STAB VIDA	Tm amplificação (°C)	Tamanho do produto (bp)
BXYJ5.060046200	Bxy_060046200_qPCR_F_CGACTCTGCCGTTAACAC Bxy_060046200_qPCR_R_TTGGTGCCTGTTCATCAGG	55,76 / 55,95	85,1	205
BXYJ5.040018300	Bxy_040018300_qPCR_F_ACAAAC TGCGCTGACTCAA Bxy_040018300_qPCR_R_ACTCCTGAATCTGGCGTA	55,29 / 55,77	86,1	181
BXYJ5.050262000	Bxy_050262000_qPCR_F_TCTCTGTTGCCGTTTCG Bxy_050262000_qPCR_R_TCCTTCAGCTTGAGAACCGT	55,78 / 56,87	87,8	164
BXYJ5.010275000	Bxy_010275000_qPCR_F_GGATCAGTCAGGAGAGCGAA Bxy_010275000_qPCR_R_GCCCGAATGCATTGACTCTT	56,25 / 55,87	85,7	160
BXYJ5.010047000	Bxy_010047000_qPCR_F_CTGCTCACCATCACCTCCTT Bxy_010047000_qPCR_R_TCCGTGCAGTTGAAAGATACC	56,89 / 54,99	86,3	150

5.6. Validação dos genes candidatos por PCR

Foi utilizado o DNA genómico anteriormente extraído e quantificado (quantificação do *NanoDrop*), tendo a amostra BXY1 439,9 ng/µL (nanograma por micro litro). Foram feitas as conversões necessárias para ajustar às condições da *Taq DNA polimerase - NZY Taq II*. A amplificação dos genes foi realizada pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) e os genes amplificados a partir do gDNA do NMP com os oligonucleótidos (*primers*) específicos para cada gene. Os transcritos foram validados a partir do cDNA do NMP.

O programa de reação de PCR foi realizado de acordo com as condições da *Taq DNA polimerase - NZY Taq II* e é o seguinte: 12,5 µL de *NZYTaq II 2x green master mix*, 0,625 µL de cada *primer forward* e *reverse* (250 nM); 1,12 µL (200 ng) de DNA genómico para a amostra BXY1, no final adicionou-se NFW até perfazer o volume de 25 µL, logo 10,13 µL para a amostra BXY1. A temperatura de *annealing* específica para cada gene foi calculada de acordo com a temperatura de *melting* do par de *primers*. A temperatura de *melting* (Tm) é a temperatura à qual metade da cadeia dupla de DNA (neste caso, os *primers* ou a sequência alvo) se dissocia transformando-se em cadeia simples. É um indicador da estabilidade térmica da interação do *primer* com o seu molde. O cálculo da Tm envolve fórmulas que consideram o comprimento do *primer*, a percentagem de bases GC (guanina-citosina, que formam ligações mais fortes) e a concentração de iões na solução. A temperatura de *annealing* (Ta) é a temperatura na qual os *primers* (pequenas sequências de DNA de cadeia simples) se ligam especificamente às suas sequências complementares no molde de DNA. Geralmente, a Ta é definida alguns graus Celsius (tipicamente 2-5°C) abaixo da Tm do *primer*, para permitir uma hibridação eficiente e específica, minimizando ligações inespecíficas.

As reações de amplificação por PCR foram realizadas no termociclador (*Biorad T100*), que automatiza o processo de amplificação de uma sequência específica de DNA a partir de uma pequena amostra, sendo rápido e simples. Em detalhe, o programa de reação de PCR utilizada consistiu em ciclos de temperaturas, iniciando pela desnaturação inicial das cadeias de DNA a 95°C durante 3min, seguindo-se 35 ciclos de amplificação do DNA. Durante os ciclos, ocorre a desnaturação do DNA (94°C), hibridação (*annealing*) dos *primers* (para cada gene), no caso dos genes BXYJ5.060046200, BXYJ5.040018300, BXYJ5.010047000 foi usado 55°C de temperatura de *annealing* enquanto os genes BXYJ5.050262000 e o BXYJ5.010275000 50°C de temperatura de *annealing*, e a etapa de extensão, ou elongação, é onde a DNA polimerase (*Taq DNA polimerase*, neste caso) sintetiza novas cadeias de DNA. Partindo dos *primers* hibridados ao molde, a polimerase adiciona nucleotídeos (bases A, T, C, G) complementares à cadeia molde, movendo-se na direção 5' para 3'. O resultado é a criação de duas novas cadeias de DNA, idênticas às cadeias originais, a partir de cada molde inicial, duplicando assim o número de moléculas de DNA alvo em cada ciclo) (72°C), cada uma com uma duração de 30s. Por fim, ocorre a extensão final de 5 minutos a 72°C, temperatura específica da *Taq DNA polimerase* utilizada (*NZYTaq II green*, *NZYTech*). Também foi posto a amostras num ciclo infinito de 4°C de forma a preservá-la.

5.7. Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose permite visualizar as bandas correspondentes à separação dos fragmentos de DNA amplificados por PCR. A separação dos fragmentos no gel é feita de acordo com o seu peso molecular. Baseia-se no princípio de que uma molécula com carga migra quando colocado num campo elétrico. A velocidade da migração depende do tamanho do fragmento e corrente elétrica aplicada. Para os ácidos nucleicos usa-se uma matriz de gel de agarose feita com uma concentração de acordo com o tamanho dos fragmentos a analisar. Durante a preparação do gel de agarose é usado um agente intercalante (intercala-se na cadeia dupla de DNA) para permitir a visualização dos fragmentos no transiluminador. Neste caso, usamos o *GreenSafe* (NZYtech, Lisboa, Portugal). A visualização é feita num transiluminador com radiação UV. Preparou-se o gel de agarose a 1%, juntando num frasco *Erlenmeyer* 0,65 g de agarose com 65 mL de TBE1X (*Tris-Boric acid-EDTA*). A agarose é derretida no tampão com recurso a um micro-ondas. Posteriormente, adicionou-se 0,9 μ L do agente intercalante *GreenSafe Premium*. Colocou-se a solução de agarose no berço de eletroforese, posicionou-se o pente e deixou-se solidificar durante cerca de 30 min. Adicionou-se o berço com o gel de agarose sólido numa tina média horizontal de eletroforese submerso em TBE 1X. Em cada poço, aplicaram-se 9 μ L de cada amostra juntamente com o *loading buffer* ou tampão de aplicação (tem como funções tornar as amostras visíveis para carregamento no gel, aumentar a densidade da amostra para que ela afunde no poço e acompanhar a migração da amostra durante a eletroforese), e num dos poços aplica-se o 3 μ L do padrão de pesos moleculares de DNA (*DNA ladder 1kB*, BIORON), a principal função dos marcadores moleculares de DNA é servir como uma referência para determinar o tamanho dos fragmentos de DNA presentes nas amostras experimentais, possuindo fragmentos de DNA com tamanhos específicos e conhecidos. A tina de eletroforese foi ligada a uma fonte de alimentação a uma intensidade de 85V (volts) durante 40min. Após terminar a corrida, observou-se no transiluminador com sistema de foto-documentação (*SMART5*, *VWR*).

5.8. Síntese do cDNA

O RNA total dos nemátodes para cada uma das condições (controlo e tratamento) foi fornecido pelo Laboratório de Nematologia. O cDNA foi sintetizado a partir de 100 ng de RNA total de acordo com o protocolo descrito abaixo.

Para a síntese de cDNA, utilizou-se o *kit SuperScript III First-Strand Synthesis System* for RT-PCR (Invitrogen, uma marca da *Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, nos Estados Unidos). Para cada condição foi preparado um microtubo

de PCR com os seguintes componentes: 0,5 μ L (100 ng) de RNA, 1 μ L de Oligo (dT) 50 μ M, 1 μ L de 10mM dNTP mix, perfazendo-se um volume final de 10 μ L com *DEPC-treated H₂O*, é um agente químico que inativa enzimas conhecidas como nucleases, em particular as RNases (ribonucleases). As reações foram incubadas num termociclador programado para 65°C durante 5 min, a temperatura de 65°C é utilizada para desnaturar as estruturas secundárias complexas do RNA, tornando-o mais acessível para a ligação dos *primers* e a ação da transcriptase reversa, para mais o calor contribui para destabilizar interações indesejadas de *primers* inespecíficos ou outros resíduos. Após este passo, os microtubos foram colocados no gelo, e uma nova mistura foi adicionada à reação anterior composta por: 2 μ L de 10x RT tampão, 4 μ L de 25 mM MgCl₂, 2 μ L de 0,1 M DTT, 1 μ L de RNase Out (40 U/ μ L) e 1 μ L de SuperScript III RT (200U/ μ L), perfazendo um volume total de 20 μ L. Os microtubos foram centrifugados e novamente incubados a 50°C durante 50 min, esta é a temperatura ótima para a atividade da *SuperScript™ III Reverse Transcriptase*, a fase de terminação da reação foi de 5 min a 85°C, esta temperatura é utilizada para desnaturar e inativar permanentemente a enzima *SuperScript™ III RT*. Isso é importante para evitar qualquer atividade enzimática residual que possa interferir em etapas subsequentes. O cDNA foi armazenado o a -20°C.

5.9. Quantificação da expressão relativa dos genes por RT-qPCR

Para quantificar a expressão relativa dos genes seccionados foi realizado um PCR em tempo real (RT-qPCR), utilizando a química de *SYBR Green (kit NZYSupreme qPCR Green Master Mix (2x))* (NZYtech, Lisboa, Portugal). Este master mix contém todos os componentes essenciais para a amplificação eficiente de ácidos nucleicos, incluindo um corante intercalante verde, dNTPs, estabilizadores e *enhancers*, estes são aditivos químicos ou substâncias incorporadas na formulação do *master mix* que visam melhorar a eficiência, especificidade, rendimento e/ou reprodutibilidade da reação de PCR em tempo real. O NZYSupreme qPCR Green Master Mix (2x) está pronto para uso e requer apenas a adição de *primers* e do molde de DNA. É otimizado para a deteção de corante verde intercalante em diferentes instrumentos.

Para cada condição (controlo e tratamento) foram preparadas duas reações com um volume final de 20 μ L, contendo: 10 μ L de *NZYSupreme qPCR Green Master Mix (2x)*, 0,8 μ L (400 nM) de *primer forward*, 0,8 μ L (400 nM) de *primer reverse*, 5 μ L (5 ng/ μ L) de cDNA, e NFW até perfazer o volume final (3,4 μ L)

A preparação das reações foi realizada em gelo, sob condições assépticas, utilizando pontas com filtro, de forma a evitar contaminações cruzadas. Foram usadas 2 réplicas

técnicas e incluiu-se um controlo negativo sem molde (NTC – *No Template Control*), para exclusão de possíveis contaminações.

As reações foram conduzidas num termociclador StepOnePlus™ (*Applied Biosystems, uma marca da Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, nos Estados Unidos*), compatível com a deteção de fluorescência SYBR Green, segundo o seguinte perfil térmico: ativação inicial da polimerase: 95°C durante 2 minutos; 40 ciclos de amplificação, com desnaturação a 95°C durante 5 segundos e *annealling/extensão* a 60°C, durante 30 segundos.

Após a fase de amplificação, foi realizada uma análise de curva de dissociação (*melting curve*), com o objetivo de avaliar a especificidade dos produtos amplificados. A primeira fase a 95°C por 15 segundos seguida de uma fase a 60°C por 1 minuto e incremento gradual da temperatura até aos 95°C com aquisição da fluorescência a cada 0,2°C/s.

5.10. Diagrama do trabalho experimental

Na Figura 7 está representado o diagrama ilustrativo das etapas da metodologia realizada. As ilustrações utilizadas foram retiradas do programa *BioRender* (disponível em <https://www.biorender.com/>)

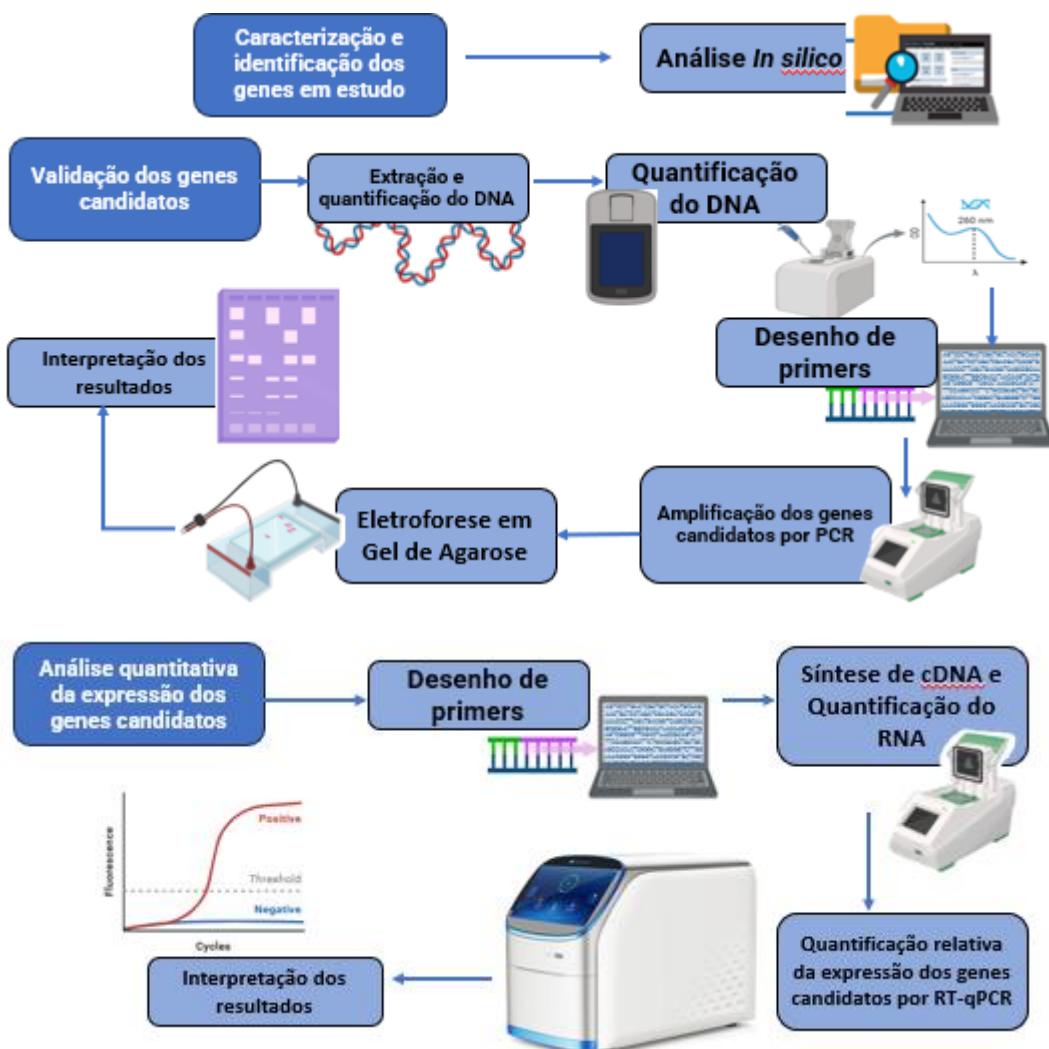


Figura 7- Diagrama ilustrativo do trabalho experimental.

6. Resultados e Discussão

6.1. Quantificação do DNA

6.1.1. Quantificação por fluorimetria

Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Tabela 3, permitindo avaliar a eficácia da extração e a adequação das amostras para análises posteriores.

Tabela 3- Quantificação das amostras por fluorimetria.

Nome amostra	Leitura (ng/μl)
BXY 1	179,12
BXY 2	36,01

Relativamente à determinação da concentração do DNA total das amostras por fluorimetria verifiquei que as concentrações entre amostras eram muito diferentes apesar de termos partido de um número de nemátodes semelhante.

6.1.2. Quantificação por espectrofotometria (NanoDrop)

Os resultados encontram-se expostos na Tabela 4.

Tabela 4-Quantificação por *NanoDrop*.

Amostra	Concentração (ng/μl)	260/280 nm	260/230 nm
BXY 1	439,9	2,14	2,04
BXY 2	615,8	2,11	2,21

Os rácios de absorbância 260/280 nm para as amostras BXY 1 e BXY 2 encontram-se dentro do intervalo esperado para DNA, aproximadamente 2,0. O rácio 260/280 nm é utilizado para avaliar a qualidade das amostras em relação à presença de proteínas; valores significativamente inferiores podem indicar contaminação por proteínas ou outras substâncias que absorvem próximo dos 280 nm.

Por sua vez, os rácios 260/230 para a BXY 1 e BXY 2 indicam uma baixa presença de contaminantes como fenóis, sais ou outros compostos utilizados durante a extração de DNA. Valores ótimos situam-se entre 2,0 e 2,2, e valores muito abaixo deste intervalo podem ser indicativos de resíduos que não foram completamente removidos.

6.2. Análise preditiva dos genes candidatos

Para a caracterização das sequências genéticas de interesse do NMP, foram empregues ferramentas bioinformáticas, como o *Basic Local Alignment Search Tool Protein* (BlastP) para análise de similaridade entre sequências depositadas em bases de dados públicas, bem como o *InterPro*, utilizado para a identificação de domínios funcionais proteicos.

As sequências de aminoácidos obtidas foram submetidas a análise por *BlastP*, que possibilitou a comparação com bancos de dados públicos de proteínas conhecidas. A identificação de domínios funcionais foi realizada através do *InterPro*, permitindo inferir sobre possíveis funções biológicas das proteínas estudadas. A Tabela 5 apresenta um resumo dos resultados obtidos. Os genes BXYJ5.010275000 e BXYJ5.050262000 codificam as enzimas capazes de degradar as paredes celulares das plantas – *endoglucanase da família GH45* e uma *pectate liase*, respectivamente. O gene BXYJ5.010047000 codifica uma proteína semelhante à transtiretina característica dos nemátodes. O gene BXYJ5.060046200 codifica uma *Acyl-dehydrogenase*. No entanto, o gene BXYJ5.040018300 codifica uma proteína que não tem o domínio conhecido nas bases de dados, podendo ser uma proteína específica deste nemátoide. Informações detalhadas sobre estas análises podem ser consultadas no Anexo 1.

As proteínas analisadas foram comparadas com organismos modelo e outros organismos filogeneticamente próximos. A identificação de domínios funcionais sugere possíveis papéis biológicos destas proteínas e sua importância na fisiologia do NMP.

Estas proteínas estão presentes noutros organismos (ortólogos), nomeadamente no *B. okinawaensis* e *B. mucronatus*, ambos nemátodes de vida livre. Também estão presentes noutras espécies como é o caso da *Limosilactobacillus* sp (bactéria), *Drosophila rúbida*, uma espécie de mosca-da-fruta nativa de áreas da Austrália. Os domínios funcionais destas quatro proteínas são pertencentes a diversas famílias de proteínas. Na análise preditiva realizada, verificou-se também, que todas as sequências dos genes associados ao parasitismo apresentaram 100% de similaridade com a espécie *Bursaphelenchus xylophilus*. Este elevado grau de identidade sugere fortemente que os genes em questão pertencem e são altamente conservados nesta espécie. A correspondência perfeita reforça a fiabilidade da predição funcional das sequências analisadas, indicando que os mecanismos de parasitismo presentes nos dados estudados são característicos de *B. xylophilus*. Tal resultado é consistente com o perfil genético desta espécie e contribui para a compreensão da sua capacidade de infeção e adaptação ao hospedeiro.

Tabela 5-Resultados da análise preditiva realizada para os genes de parasitismo em estudo. A análise de similaridade de sequências e análise do domínio funcional das proteínas foi realizada pelos softwares BlastP e InterPro, respectivamente.

Identificação dos genes	BLASTP						Domínio funcional
	Descrição	Accession number	E-value	Similariedade	Ortólogos		
BXYJ5.060046200	Acyl-dehydrogenase	CAD5233697.1	0.0	100%	<i>B. okinawaensis</i> (81,86%) <i>Aphelenchoides besseyi</i> (61,23%)		IPR012258
BXYJ5.040018300	[<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>] unnamed protein product	CAD5224545.1	0.0	100%	<i>Limosilactobacillus sp</i> (67,37%) <i>Drosophila rubida</i> (66,94%)		IPR003582
BXYJ5.010047000	(pine wood nematode hypothetical protein) transthyretin-like protein	CAD5208234.1	2e-91	100%	<i>Hemonchus contortus</i> (46,88%) <i>Gnathostoma spinigerum</i> (45,16%)		IPR038479 IPR001534
BXYJ5.050262000	Pectate lyase	BAE48369.1	0.0	100%	<i>B. mucronatus</i> (89,22%) <i>B. okinawaensis</i> (66,53%)		IPR004898 IPR002022 IPR012334
BXYJ5.010275000	Glycosyl hydrolase family 45	CAD5212099.1	3e-171	100%	<i>B. okinawaensis</i> (78,70%) <i>B. mucronatus</i> (68,14%)		IPR036908 IPR000334

6.3. Validação dos genes candidatos

As duas amostras de DNA genómico de *B. xylophilus* extraídas neste estudo apresentaram concentrações de 439,9 ng/µL e 615,8ng/µL. Os genes foram apenas amplificados por PCR com os *primers* full length específicos para os diferentes genes, a partir do DNA. A presença dos fragmentos de DNA amplificados foi avaliada por eletroforese em gel de agarose, com visualização sob luz UV, conforme ilustrado na Figura 8 obtida após corrida. À esquerda do gel encontra-se um padrão de pesos moleculares (DNA *ladder* 1kB, BIORON), utilizada como referência para estimar o tamanho dos fragmentos de DNA presentes nas diferentes amostras. Esta *ladder* apresenta bandas com tamanhos bem definidos, variando de 250 a 10.000 pares de bases (bp). Os resultados foram interpretados com base nos tamanhos esperados de cada produto amplificado, conforme descrito abaixo.

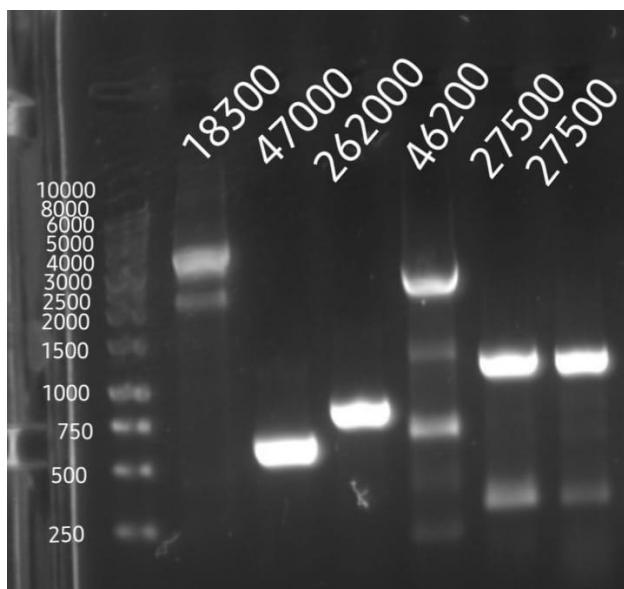


Figura 8- Gel de agarose com os fragmentos de DNA amplificados.

A amplificação do gene BXYJ5.040018300 revelou 2 bandas com tamanhos aproximados de 4000 bp e 2500 bp, superiores ao fragmento esperado de aproximadamente 1908 bp. A ausência da banda no tamanho esperado, aliada à presença de múltiplos produtos, sugere uma reação com baixa especificidade, possivelmente.

O gene BXYJ5.010047000 apresentou uma única banda nítida com aproximadamente 500 bp coincidente com o tamanho esperado de 542 bp. A ausência de produtos adicionais confirma a especificidade da reação, evidenciando um desempenho eficiente da amplificação.

De forma semelhante, a reação para o gene BXYJ5.050262000 resultou numa banda única de cerca de 700 bp, correspondendo ao tamanho previsto 746. Tal como no gene anterior, a especificidade da reação foi adequada, demonstrando que os *primers* utilizados são eficazes para a amplificação deste alvo.

Para o gene BXYJ5.060046200, observou-se uma banda de ~2500 bp compatível com o tamanho esperado de 2356 bp, no entanto, estavam também presentes bandas inespecíficas adicionais. Estes resultados indicam que, apesar da amplificação do fragmento desejado ter ocorrido, a reação apresentou algum grau de inespecificidade, o que poderá ser atribuído à inespecificidade dos *primers* para a sequência de interesse.

Finalmente, as duas reações independentes para o gene BXYJ5.01027500 evidenciaram bandas principais com tamanho aproximado de 1250 bp, de acordo com o esperado, 1124 bp. Contudo, foram igualmente detetadas bandas secundárias de menor tamanho, o que indica a ocorrência de amplificação inespecífica. Embora a banda alvo esteja presente em ambas as reações, a inespecificidade observada poderá comprometer a fiabilidade dos resultados caso não sejam implementadas estratégias de otimização, como por exemplo o aumento ou a diminuição da temperatura de *annealing*.

Em suma, os genes BXYJ5.010047000 e BXYJ5.050262000 apresentaram amplificação específica e eficiente. Por outro lado, os genes BXYJ5.040018300, BXYJ5.060046200 e BXYJ5.010275000 revelaram graus variáveis de inespecificidade. Procedeu-se à otimização das condições de PCR para estes genes, especificamente ajustando a temperatura de *annealing* no termociclador para assegurar a especificidade e reproduzibilidade das reações.

Com base na análise inicial dos perfis de amplificação, foram implementadas alterações nas condições de PCR com o objetivo de melhorar a especificidade das reações. Para os genes BXYJ5.060046200 e BXYJ5.010275000, observando-se a presença de produtos inespecíficos, procedeu-se ao aumento da temperatura de *annealing*, no termociclador, para 58°C anteriormente a temperatura designada seria de 50°C para o gene BXYJ5.010275000 e 55°C para o gene BXYJ5.060046200, de forma a restringir a ligação dos *primers* apenas às sequências-alvo desejadas.

Por outro lado, no caso do gene BXYJ5.040018300, em que a banda esperada (1908 bp) não foi detetada e surgiram produtos de tamanhos superiores, optou-se por diminuir a temperatura de *annealing*, no termociclador, para 48°C, anteriormente a temperatura designada seria de 55°C. Esta modificação teve como objetivo facilitar a hibridação dos *primers* ao molde, considerando a possibilidade de baixa eficiência de ligação às sequências-alvo nas condições anteriormente testadas.

Os genes BXYJ5.010047000 e BXYJ5.050262000 foram selecionados para a fase de validação da expressão relativa por RT-qPCR.

6.4. Validação da expressão relativa dos genes

A análise de expressão relativa dos genes BXYJ5.010047000 e BXYJ5.050262000 foram realizados por RT-qPCR, com a química de *SYBR Green*. Para cada condição, tratamento-silenciamento e controlo, fizeram-se duas réplicas técnicas. O gene de referência utilizado foi a actina (de acordo com [30]). O valor de Cq (*quantification cycle*) no contexto de uma análise de PCR em tempo real (qPCR), correspondem ao número do ciclo no qual o sinal de fluorescência gerado pela amplificação do DNA atinge um nível detetável que excede o ruído de fluorescência (*threshold*), em outras palavras, o Cq é o ponto no qual a reação entra na fase exponencial de amplificação e a fluorescência começa a aumentar significativamente acima da linha de base. Podemos observar na Figura 9 a curva de amplificação e perceber o posicionamento dos valores de Cq.

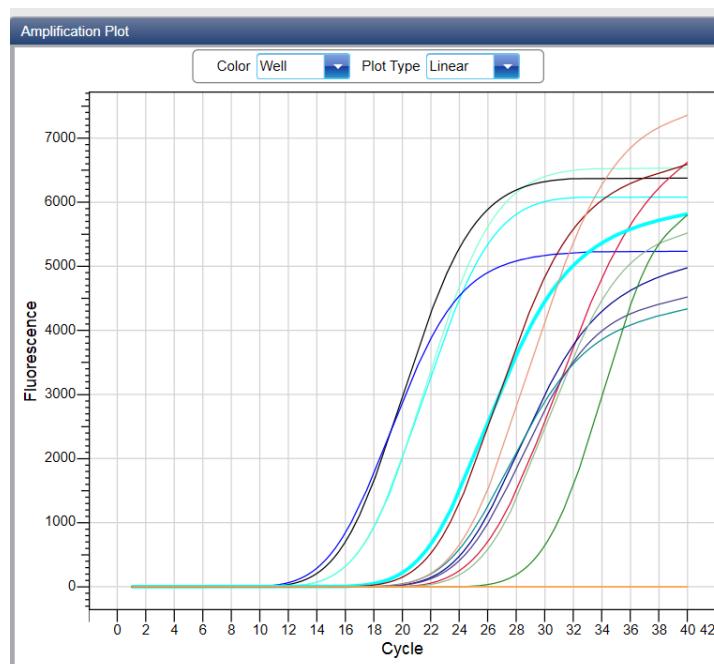


Figura 9- Curva de amplificação.

Em relação à *melting curve* dos genes BXYJ5.010047000 e BXYJ5.050262000 estas apresentaram um único pico significando uma amplificação específica e sem formação de dímeros de *primers*. No entanto, as réplicas técnicas apresentam alguma

variação, o que poderá ter resultado de erros de pipetagem ou descalibração das micropipetas. A presença de um único pico de *melting* foi interpretada como indicativo de um produto específico, como podemos verificar nas Figuras 10 e 11 referentes às *melting curves* dos dois genes, enquanto múltiplos picos ou presença de um pico foram considerados sugestivos de amplificações inespecíficas ou formação de dímeros de *primers*, respetivamente

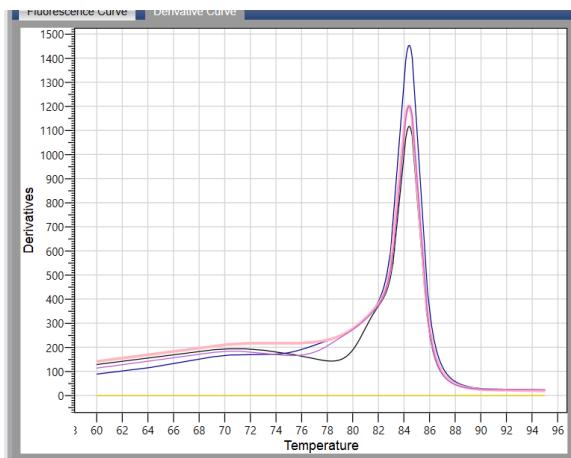


Figura 10- Melting curve do gene BXYJ5.010047000.

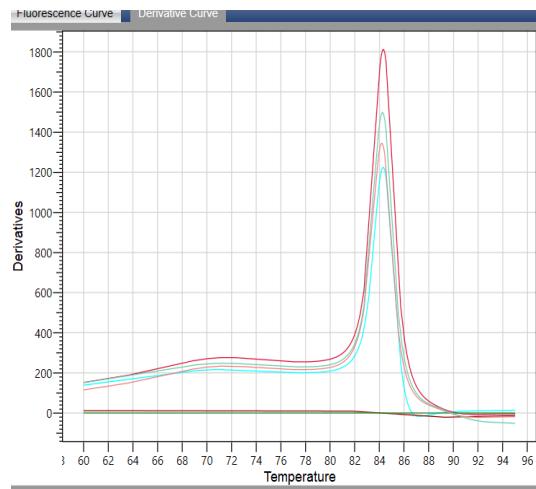


Figura 11- Melting curve do gene BXYJ5.050262000

A análise da expressão relativa pelo método de Livak (2001), conhecido como $(2^{-\Delta\Delta Cq})$ é uma metodologia padrão em qPCR para quantificar alterações na expressão génica, os resultados estão expostos na Tabela 6. Presumindo eficiências de amplificação próximas de 100% para o gene alvo e o gene de referência (endógeno), o método compara a expressão do gene de interesse entre amostras, normalizando-a com gene de referência. O resultado é uma "fold change" que indica que a alteração da expressão superiores a 1 representam aumento (*up-regulation*) da regulação, inferiores a 1 indicam diminuição (*down-regulation*) da expressão, e igual a 1 significa ausência de alteração significativa. Essencialmente, Livak permite determinar a expressão diferencial de genes, fornecendo uma medida relativa da abundância de mRNA em resposta a diferentes condições.

Tabela 6-Análise da expressão relativa pelo método de Livak (2001).

Condição	Gene	Cq	Normalização amostra controlo	Normalização amostra tratamento	$\Delta\Delta Cq$	$2^{-\Delta\Delta Cq}$	Média $2^{-\Delta\Delta Cq}$	Desvio Padrão
Cont	Actina	17,7						
Cont	Actina	17,67						
Trat	Actina	16,29						
Trat	Actina	15,89						
Cont	262000	23,78	6,08					
Cont	262000	21,31	3,64					
Trat	262000	27,49		11,2	5,12	0,028755864	0,020679821	0,01142125
Trat	262000	25,84		9,95	6,31	0,012603777		
Cont	47000	23,91	6,21					
Cont	47000	22,52	4,85					
Trat	47000	25,64		9,35	3,14	0,113439894	0,071502098	0,059309001
Trat	47000	25,82		9,93	5,08	0,029564301		

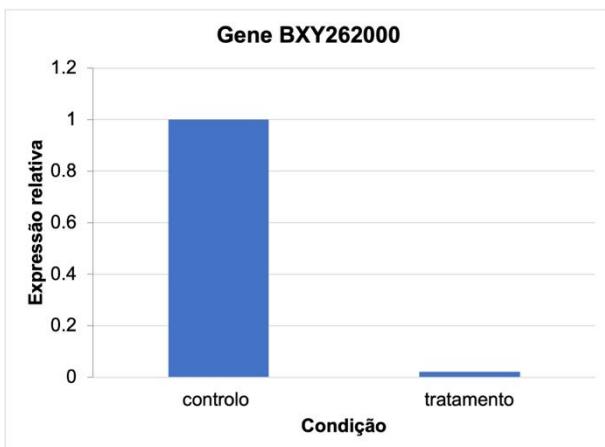


Figura 12- Expressão relativa dos genes BXYJ5.050262000 nas condições de controlo e tratamento.

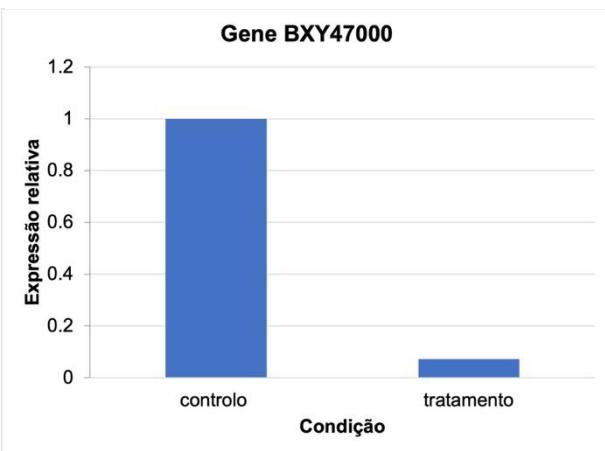


Figura 13- Expressão relativa dos genes BXYJ5.010047000 nas condições de controlo e tratamento.

Foram analisadas amostras sob duas condições: controlo e tratamento com silenciamento. Os resultados, tal como mostra a Figura 12 e 13, mostraram uma clara redução na expressão dos genes alvo na condição de tratamento em comparação com o controlo.

O método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Cq}$) compara a expressão de um gene de interesse numa condição experimental em relação a uma condição de controlo, normalizado com um gene de referência, neste caso, a actina. Na análise de expressão génica por RT-qPCR, a actina é utilizada como gene de referência porque a sua expressão é constante e estável entre diferentes amostras e condições experimentais.

Isto significa que ao nível de mRNA da actina não varia significativamente, mesmo quando outros genes estão a

ser regulados (ativados ou silenciados). Pode garantir, então, que as diferenças observadas na expressão dos genes de interesse se devem ao tratamento experimental e não a erros técnicos ou variações biológicas não controladas. Em detalhe, este método tem os seguintes passos:

- O 1º passo foi calcular o ΔCq da amostra tratamento, tal como mostra a Equação (1):

$$\Delta Cq \text{ tratamento} = Cq \text{ gene de interesse} - Cq \text{ gene de tratamento} \quad (1)$$

- O 2º passo foi calcular o ΔCq da amostra controlo, tal como mostra a Equação (2):

$$\Delta Cq \text{ controlo} = Cq \text{ gene de interesse} - Cq \text{ gene de referência} \quad (2)$$

- O 3º passo foi calcular o $\Delta\Delta Cq$, tal como mostra a Equação (3) :

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq \text{ tratamento} - \Delta Cq \text{ controlo} \quad (3)$$

- O 4º passo foi calcular a expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Cq}$).

O valor final representa a expressão relativa dos genes na amostra tratamento em relação ao controlo, normalizada com o gene de referência. Os valores são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7- Interpretação da expressão relativa dos genes

Gene	Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Cq}$)	Fold-change	Interpretação
BXYJ5.050262000	0,0287	~35 vezes	Forte redução da expressão em cerca de 35X.
BXYJ5.010047000	0,0715	~14 vezes	Redução significativa da expressão em cerca de 14X.

Os resultados obtidos, estão expostos resumidamente na Tabela 7 e indicam que o tratamento com silenciamento teve um efeito eficaz sobre os genes alvo. Observou-se uma redução de cerca de 35 vezes na expressão de BXYJ5.050262000 e de 14 vezes na expressão de BXYJ5.010047000, quando comparadas com a condição de controlo. Estes dados demonstram que o silenciamento do fator de transcrição (*zinc finger C2H2*) resultou na redução da expressão destes 2 genes, com uma redução maior para o gene BXY262000, sugerindo que ambos os genes poderão estar a ser regulados positivamente pelo FT.

7. Conclusões

O presente trabalho de estágio teve como objetivo central a validação, por PCR quantitativo, da expressão de genes no nemátoide da madeira do pinheiro (NMP) em resposta ao silenciamento de proteínas do tipo *zinc finger*. Este estudo insere-se num contexto de grande relevância, dado o impacto devastador do NMP (*Bursaphelenchus xylophilus*) na floresta de pinho, especialmente em Portugal, e a crescente necessidade de desenvolver estratégias inovadoras para o seu controlo.

Os resultados obtidos, através da metodologia de PCR quantitativo, permitiram validar a expressão de diversos genes. Dentre eles, dois genes específicos, BXYJ5.050262000 e BXYJ5.010047000, tiveram a sua quantificação finalizada e foram considerados subexpressos após o silenciamento das proteínas *zinc finger*. O gene BXYJ5.050262000 codifica enzimas capazes de degradar as paredes celulares das plantas, um fator crucial na patogenicidade do NMP. Por sua vez, o gene BXYJ5.010047000 codifica uma proteína semelhante à transtiretina, uma proteína característica dos nemátodes e associada ao parasitismo.

A observação da subexpressão destes genes críticos após o silenciamento das proteínas *zinc finger* sugere um papel mais complexo e multifacetado para estas proteínas na regulação génica do NMP, a subexpressão dos genes BXYJ5.050262000 e BXYJ5.010047000 indica que as proteínas *zinc finger* podem estar envolvidas na ativação ou na manutenção dos níveis de expressão desses genes de virulência e parasitismo. Em outras palavras, a ausência da função normal das *zinc fingers* pode resultar numa diminuição da capacidade do nemátoide em produzir as ferramentas necessárias para degradar as células vegetais e para manter o seu estado de parasita.

Esta descoberta, se consistente e replicável, abre portas para o desenvolvimento de novas abordagens no controlo do NMP. A compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à virulência e adaptação do NMP é fundamental para a identificação de alvos terapêuticos ou de manipulação genética. Ao elucidar que o silenciamento de *zinc fingers* pode impactar negativamente a expressão de genes de virulência e de parasitismo, este estudo contribui significativamente para o conhecimento fundamental da biologia deste parasita e para a identificação de possíveis estratégias de interferência.

No futuro, esta investigação poderá ser aprofundada através da identificação e caracterização funcional dos outros genes cuja expressão se mostrou alterada (seja

aumentada ou diminuída). A análise das vias biológicas envolvidas e o impacto destas alterações na fisiologia e patogenicidade do NMP serão passos cruciais. Em última instância, os conhecimentos gerados por este estágio poderão ser a base para o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas, como a edição genética ou o uso de RNA de interferência (RNAi), de modo a enfraquecer ou a eliminar o NMP, oferecendo uma esperança para a proteção dos ecossistemas florestais afetados.

8. Referências Bibliográficas

1. Espada, M.; Mendonça, M.; Mota, M.; Inácio, M. de L. *AGROTEC, 45. December 2022*, pp. 64–65.
2. Kim, B.N.; Kim, J.H.; Ahn, J.Y.; Kim, S.; Cho, B.K.; Kim, Y.H.; Min, J. *A Short Review of the Pinewood Nematode, Bursaphelenchus Xylophilus. Toxicol Environ Health Sci* 2020, 12.
3. Mota, M.M.; Braasch, H.; Bravo, M.A.; Penas, A.C.; Burgermeister, W.; Metge, K.; Sousa, E. *First Report of Bursaphelenchus Xylophilus in Portugal and in Europe. Nematology* 1999, 1, doi:10.1163/156854199508757.
4. Vicente, C.; Espada, M.; Vieira, P.; Mota, M. *Pine Wilt Disease: A Threat to European Forestry. Eur J Plant Pathol* 2012, 133, 89–99.
5. Fonseca, L.; Cardoso, J.M.S.; Lopes, A.; Pestana, M.; Abreu, F.; Nunes, N.; Mota, M.; Abrantes, I. *The Pinewood Nematode, Bursaphelenchus Xylophilus, in Madeira Island. Helminthologia* 2012, 49, doi:10.2478/s11687-012-0020-3.
6. Robertson, L.; Cobacho Arcos, S.; Escuer, M.; Santiago Merino, R.; Esparrago, G.; Abelleira, A.; Navas, A. *Incidence of the Pinewood Nematode Bursaphelenchus Xylophilus Steiner & Buhrer, 1934 (Nickle, 1970) in Spain. Nematology* 2011, 13, 755–757, doi:10.1163/138855411X578888.
7. Sousa, E.; Bravo, M.A.; Pires, J.; Naves, P.; Penas, A.C.; Bonifácio, L.; Mota, M.M. *Bursaphelenchus Xylophilus (Nematoda: Aphelenchoididae) Associated with Monochamus Galloprovincialis (Coleoptera: Cerambycidae) in Portugal. Nematology* 2001, 3, doi:10.1163/156854101300106937.
8. Fonseca, L.; Silva, H.; Cardoso, J.M.S.; Esteves, I.; Maleita, C.; Lopes, S.; Abrantes, I. *Bursaphelenchus Xylophilus in Pinus Sylvestris—The First Report in Europe. Forests* 2024, 15, 1556, doi:10.3390/f15091556.
9. Perry, R.N.; Moens, M. *Introduction to Plant-Parasitic Nematodes; Modes of Parasitism. In Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*; Springer Netherlands, 2011; pp. 3–20.
10. Jones, J.T.; Haegeman, A.; Danchin, E.G.J.; Gaur, H.S.; Helder, J.; Jones, M.G.K.; Kikuchi, T.; Manzanilla-López, R.; Palomares-Rius, J.E.; Wesemael, W.M.L.; et al. *Top 10 Plant-Parasitic Nematodes in Molecular Plant Pathology. Mol Plant Pathol* 2013, 14.

11. Smant, G.; Helder, J.; Goverse, A. *Parallel Adaptations and Common Host Cell Responses Enabling Feeding of Obligate and Facultative Plant Parasitic Nematodes*. *Plant Journal* 2018, 93, doi:10.1111/tpj.13811.
12. Palomares-Rius, J.E.; Escobar, C.; Cabrera, J.; Vovlas, A.; Castillo, P. *Anatomical Alterations in Plant Tissues Induced by Plant-Parasitic Nematodes*. *Front Plant Sci* 2017, 8, doi:10.3389/fpls.2017.01987.
13. Espada, M.; Silva, A.C.; Eves Van Den Akker, S.; Cock, P.J.A.; Mota, M.; Jones, J.T. *Identification and Characterization of Parasitism Genes from the Pinewood Nematode *Bursaphelenchus Xylophilus* Reveals a Multilayered Detoxification Strategy*. *Mol Plant Pathol* 2016, 17, doi:10.1111/mpp.12280.
14. Eves-van den Akker, S. *Plant–Nematode Interactions*. *Curr Opin Plant Biol* 2021, 62.
15. Vieira, P.; Gleason, C. *Plant-Parasitic Nematode Effectors — Insights into Their Diversity and New Tools for Their Identification*. *Curr Opin Plant Biol* 2019, 50.
16. Espada, M.; Eves-van den Akker, S.; Maier, T.; Paramasivan, V.; Baum, T.; Mota, M.; Jones, J.T. *STATAWAARS: A Promoter Motif Associated with Spatial Expression in the Major Effector-Producing Tissues of the Plant-Parasitic Nematode *Bursaphelenchus Xylophilus**. *BMC Genomics* 2018, 19, doi:10.1186/s12864-018-4908-2.
17. Hewezi, T.; Baum, T.J. *Manipulation of Plant Cells by Cyst and Root-Knot Nematode Effectors*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2013, 26.
18. Goverse, A.; Smant, G. *The Activation and Suppression of Plant Innate Immunity by Parasitic Nematodes*. *Annu Rev Phytopathol* 2014, 52, doi:10.1146/annurev-phyto-102313-050118.
19. Pellegrin, C.; Damm, A.; Sperling, A.L.; Molloy, B.; Shin, D.S.; Long, J.; Brett, P.; Bravo, A.D.-T.; Lynch, S.J.; Senatori, B.; et al. *The SUbventral-Gland Master Regulator (SUGR) of Nematode Virulence* 2024.
20. Pellegrin, C.; Damm, A.; Sperling, A.L.; Molloy, B.; Shin, D.S.; Long, J.; Brett, P.; Iguh, T.C.; Kranse, O.P.; Bravo, A.D.-T.; et al. *The SUbventral-Gland Regulator (SUGR-1) of Nematode Virulence*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2025, 122, doi:10.1073/pnas.2415861122.
21. Sato, K.; Kadota, Y.; Shirasu, K. *Plant Immune Responses to Parasitic Nematodes*. *Front Plant Sci* 2019, 10.

22. Ngwa, C.; Farrukh, A.; Pradel, G. *Zinc Finger Proteins of Plasmodium Falciparum*. *Cell Microbiol* 2021, 23, n°12, doi:10.1111/cmi.13387.
23. Singh, J.K.; van Attikum, H. *DNA Double-Strand Break Repair: Putting Zinc Fingers on the Sore Spot*. *Semin Cell Dev Biol* 2021, 113.
24. Cassandri, M.; Smirnov, A.; Novelli, F.; Pitolli, C.; Agostini, M.; Malewicz, M.; Melino, G.; Raschellà, G. *Zinc-Finger Proteins in Health and Disease*. *Cell Death Discov* 2017, 3.
25. Haerty, W.; Artieri, C.; Khezri, N.; Singh, R.S.; Gupta, B.P. *Comparative Analysis of Function and Interaction of Transcription Factors in Nematodes: Extensive Conservation of Orthology Coupled to Rapid Sequence Evolution*. *BMC Genomics* 2008, 9, doi:10.1186/1471-2164-9-399.
26. Seetharam, A.; Stuart, G.W. *A Study on the Distribution of 37 Well Conserved Families of C2H2 Zinc Finger Genes in Eukaryotes*. *BMC Genomics* 2013, 14, doi:10.1186/1471-2164-14-420.
27. Tavares, T.S.; Mügge, F.L.B.; Grazielle-Silva, V.; Valente, B.M.; Goes, W.M.; Oliveira, A.E.R.; Belew, A.T.; Guarneri, A.A.; Pais, F.S.; El-Sayed, N.M.; et al. *A Trypanosoma Cruzi Zinc Finger Protein That Is Implicated in the Control of Epimastigote-Specific Gene Expression and Metacyclogenesis*. *Parasitology* 2021, 148, 1171–1185, doi:10.1017/S0031182020002176.
28. Blum, N.U.; Haupt, M.; Bening, C.R. *Why “Circular” Doesn’t Always Mean “Sustainable.”* *Resour Conserv Recycl* 2020, 162.
29. Untergasser, A.; Cutcutache, I.; Koressaar, T.; Ye, J.; Faircloth, B.C.; Remm, M.; Rozen, S.G. *Primer3-New Capabilities and Interfaces*. *Nucleic Acids Res* 2012, 40, doi:10.1093/nar/gks596.
30. Vicente, C.S.L.; Ikuyo, Y.; Shinya, R.; Mota, M.; Hasegawa, K. *Catalases Induction in High Virulence Pinewood Nematode *Bursaphelenchus Xylophilus* under Hydrogen Peroxide-Induced Stress*. *PLoS One* 2015, 10, doi:10.1371/journal.pone.0123839.
31. Kanel, G.C. *Developmental, Familial, and Metabolic Disorders*. In *Atlas of Liver Pathology*; Elsevier, 2024; pp. 271–330.e10.
32. Lang, T.F.; Hussain, K. *Pediatric Hypoglycemia*. In; 2014; pp. 211–245.

33. Hugouvieux-Cotte-Pattat, N.; Condemine, G.; Shevchik, V.E. *Bacterial Pectate Lyases, Structural and Functional Diversity*. *Environ Microbiol Rep* 2014, 6, 427–440, doi:10.1111/1758-2229.12166.
34. Rangaraju, S.; Khoo, K.K.; Feng, Z.-P.; Crossley, G.; Nugent, D.; Khaytin, I.; Chi, V.; Pham, C.; Calabresi, P.; Pennington, M.W.; et al. *Potassium Channel Modulation by a Toxin Domain in Matrix Metalloprotease 23*. *Journal of Biological Chemistry* 2010, 285, 9124–9136, doi:10.1074/jbc.M109.071266.
35. Shafee, T.; Mitchell, M.L.; Norton, R.S. *Mapping the Chemical and Sequence Space of the ShKT Superfamily*. *Toxicon* 2019, 165, 95–102, doi:10.1016/j.toxicon.2019.04.008.
36. Escuder-Rodríguez, J.-J.; González-Suarez, M.; deCastro, M.-E.; Saavedra-Bouza, A.; Becerra, M.; González-Siso, M.-I. *Characterization of a Novel Thermophilic Metagenomic GH5 Endoglucanase Heterologously Expressed in Escherichia Coli and Saccharomyces Cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts* 2022, 15, 76, doi:10.1186/s13068-022-02172-4.
37. Amengual, N.G.; Csarman, F.; Wohlschlager, L.; Ludwig, R. *Expression and Characterization of a Family 45 Glycosyl Hydrolase from Fomitopsis Pinicola and Comparison to Phanerochaete Chrysosporium Cel45A*. *Enzyme Microb Technol* 2022, 156, 110000, doi:10.1016/j.enzmictec.2022.110000.
38. Hennebry, S.C.; Wright, H.M.; Likic, V.A.; Richardson, S.J. *Structural and Functional Evolution of Transthyretin and Transthyretin-like Proteins*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 2006, 64, 1024–1045, doi:10.1002/prot.21033.

A. Anexos

Domínios do gene BXYJ5.060046200

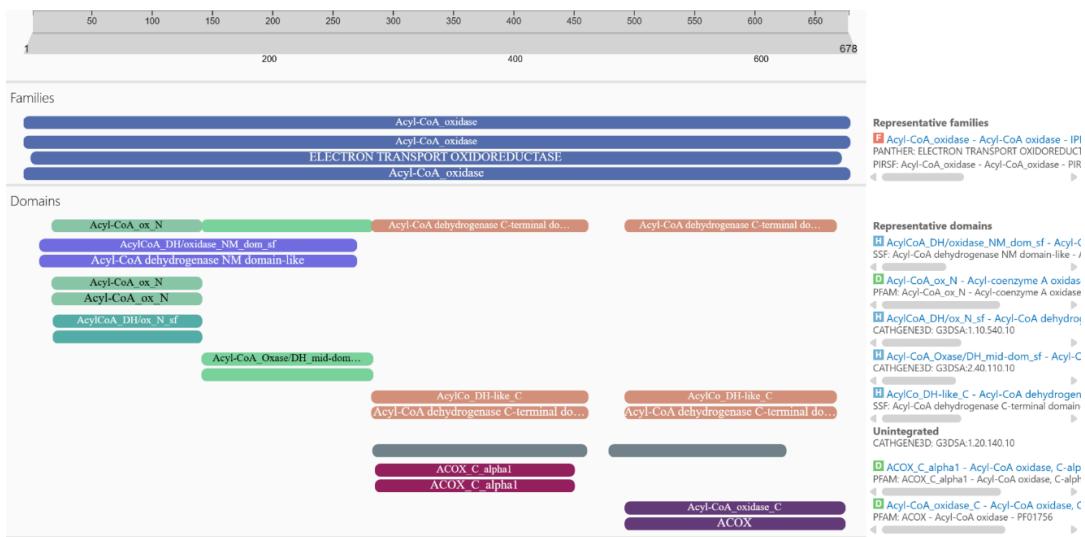


Figura 14- Domínios funcionais do gene BXYJ5.060046200.

Através da Figura 14 podemos ter uma noção dos principais domínios funcionais deste gene onde se destacam as enzimas Acil-CoA desidrogenases.

As enzimas **Acil-CoA desidrogenases** constituem uma família de enzimas mitocondriais fundamentais na degradação dos ácidos gordos, num processo conhecido como beta-oxidação. Estas enzimas catalisam especificamente a primeira reação de cada ciclo de beta-oxidação, ao introduzirem uma ligação dupla entre os carbonos alfa e beta dos tioésteres de acil-CoA, através da remoção de dois átomos de hidrogénio [31].

Além do seu papel central na degradação de lípidos, estas enzimas também participam no metabolismo de certos aminoácidos, em particular os aminoácidos cetogénicos — aqueles que podem ser convertidos em corpos cetónicos utilizados como fonte de energia.

Entre as suas principais funções destacam-se:

- Beta-oxidação de ácidos gordos: As acil-CoA desidrogenases iniciam a via de beta-oxidação, um processo que converte os ácidos gordos em moléculas menores, as quais são posteriormente utilizadas na produção de energia celular [32].
- Metabolismo de aminoácidos: Algumas variantes desta enzima intervêm na degradação de aminoácidos cetogénicos, contribuindo para a geração de corpos

cetônicos, uma importante fonte energética, especialmente em estados de jejum prolongado ou exercício intenso [31].

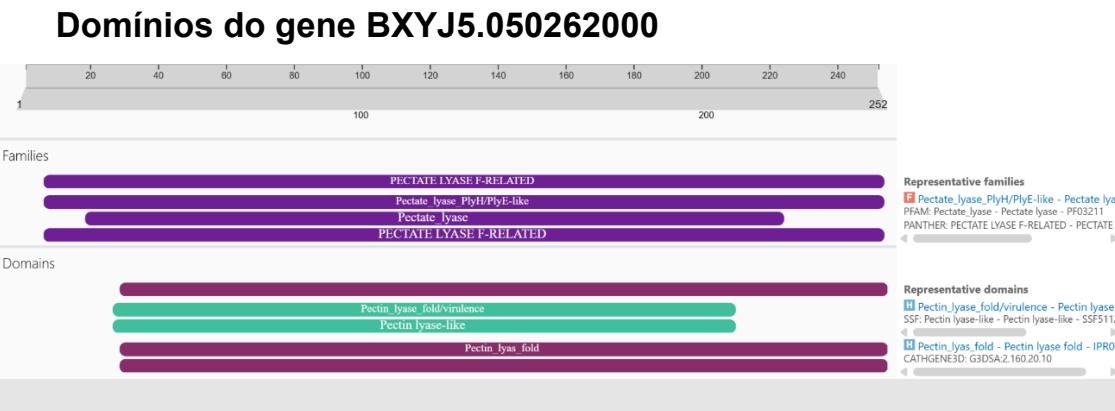


Figura 15- Domínios funcionais do gene BXYJ5.050262000.

Através da Figura 15 podemos ter uma noção dos principais domínios funcionais deste gene onde se destacam a enzima *Pectate lyases*.

As ***Pectate lyases*** (pectato liases) são enzimas envolvidas na degradação da parede celular das plantas. Eles clivam pectina usando um mecanismo de eliminação de β , específico para polissacarídeos ácidos. Eles são produzidos principalmente por patógenos vegetais e organismos associados a plantas, e apenas raramente por animais. As liases de pectato também são comumente produzidas no mundo bacteriano, seja por bactérias que vivem em estreita proximidade com as plantas ou por bactérias intestinais que encontram material vegetal no trato digestivo de seus hospedeiros. O papel das *pectate lyases* é essencial para patógenos vegetais, como *Dickeya dadantii*, que usam um conjunto de *pectate lyases* como seu principal fator de virulência [33].

Domínios do gene BXYJ5.040018300

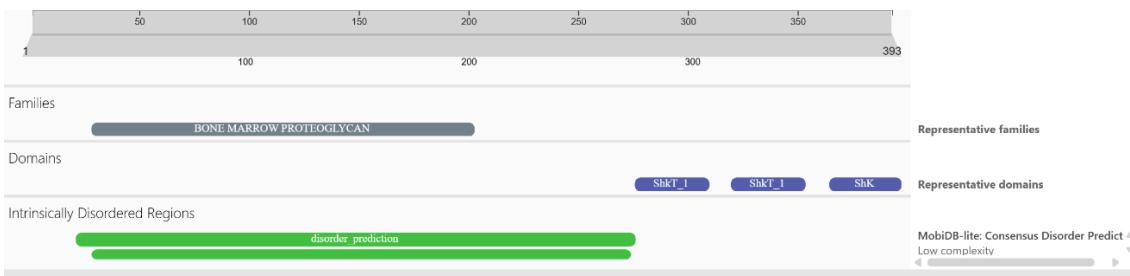


Figura 16-Domínios funcionais do gene BXYJ5.040018300.

Através da Figura 16 podemos ter uma noção dos principais domínios funcionais deste gene onde se destacam a proteína ShKT.

ShKT (*Stichodactyla helianthus potassium channel toxin*), mais conhecido é a toxina ShK, refere-se a um domínio proteico encontrado em várias proteínas, incluindo toxinas de anémonas-do-mar (*Stichodactyla helianthus*), que bloqueia canais de potássio, e também a uma família de proteínas relacionada. O domínio ShKT é caracterizado por conter seis resíduos de cisteína conservados e está presente em diversas proteínas, incluindo aquelas com funções relacionadas a enzimas, fatores de crescimento e protease [34].

O domínio ShKT está envolvido em diversas funções, como modulação de canais de potássio, envolvimento em vias de morfogénese e bloqueio de canais de potássio dependentes de voltagem [35]. Também foi demonstrado que o domínio ShKT está envolvido na inibição da morte celular programada em nemátodes parasitas de animais [35].

Domínios do gene BXYJ5.010275000

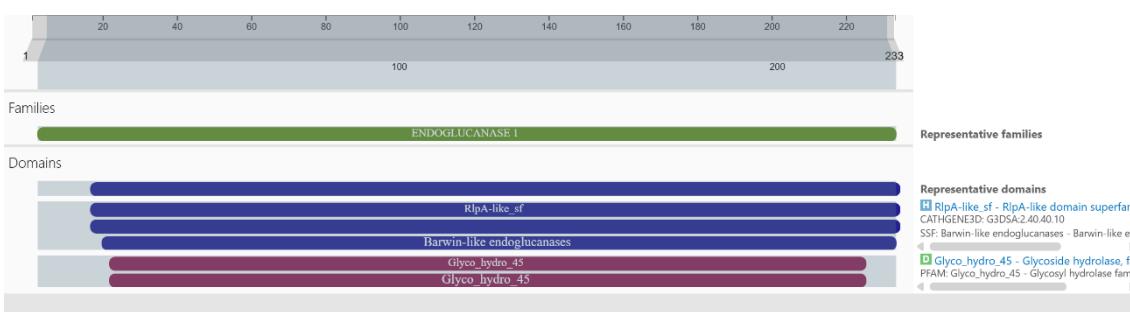


Figura 17- Domínios funcionais do gene BXYJ5.010275000.

Através da Figura 17 podemos ter uma noção dos principais domínios funcionais deste gene onde se destacam as enzimas GH45.

A **família 45 da glicosil-hidrolase (GH45)** compreende um grupo de enzimas conhecidas como endoglucanases, que estão envolvidas na degradação da celulose. Estas enzimas são particularmente notáveis pelo seu pequeno tamanho, alta termoestabilidade e distribuição generalizada em vários organismos. As endoglucanases GH45 são utilizadas em aplicações industriais como a produção de têxteis e detergentes [36]. As enzimas GH45 por serem endoglucanases, têm como principal função clivar as ligações internas β -1,4-glicosídicas nas cadeias de celulose. São relativamente pequenos, tipicamente variando de 20-45 kDa, o que pode permitir que as enzimas penetrem em espaços menores em estruturas de celulose [37].

Domínios do gene BXYJ5.010047000

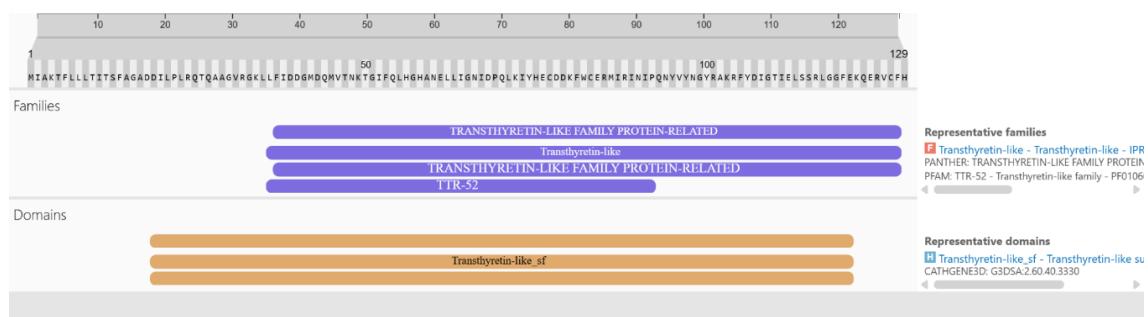


Figura 18- Domínios funcionais do gene BXYJ5.010047000.

Através da Figura 18 podemos ter uma noção dos principais domínios funcionais deste gene onde se destacam a proteína *transthyretin like proteins*.

A **transtirretina (TTR)** é uma proteína tetramérica envolvida na distribuição das hormonas tiroideias em vertebrados. A sequência de aminoácidos do TTR é altamente conservada em vertebrados. As *transthyretin like proteins* (TLPs) do tipo TTR foram inferidas a partir da identificação de genes em espécies não vertebradas. As TLP foram divididas em três grupos principais com base nas suas regiões N-terminais. A maioria dos TLPs são citosólicas, mas em plantas e mofo de lodo, prevê-se que sejam peroxissomais. *Transthyretin-like proteins* são um grupo diversificado de proteínas com semelhanças estruturais com a TTR, mas com diferentes papéis funcionais, incluindo papéis no metabolismo da purina, regulação do crescimento de plantas e interações célula-célula [38].