



UNIVERSIDADE
DE ÉVORA

Departamento de Química e Bioquímica
Curso de Licenciatura em Bioquímica

**Avaliação da capacidade de degradação de xenobióticos
do nemátode fitoparasita *Pratylenchus penetrans***

Relatório de Estágio

Realizado por: Joana Filipa Cristo Ratado

Orientador: Doutora Cláudia Vicente

Coorientador: Doutora Margarida Espada

Évora
2024



Departamento de Química e Bioquímica
Curso de Licenciatura em Bioquímica

**Avaliação da capacidade de degradação de xenobióticos
do nemátode fitoparasita *Pratylenchus penetrans***

Relatório de Estágio

Realizado por: Joana Filipa Cristo Ratado

Orientador: Doutora Cláudia Vicente

Coorientador: Doutora Margarida Espada

Évora

2024

“Este trabalho não inclui as observações do júri”

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer às minhas orientadoras, Doutora Cláudia Vicente e Doutora Margarida Espada por toda a dedicação e apoio recebidos ao longo deste estágio, pelos conhecimentos transmitidos e por nunca terem desistido de mim. Foram, sem dúvida, uma fonte de inspiração nesta experiência que revelou ser uma das mais enriquecedoras durante todo o meu percurso académico. Sinto-me grata por ter tido a oportunidade de trabalhar no laboratório de Nematologia (NemaLab), do qual faz parte uma equipa de profissionais que sempre me acolheu e ajudou da melhor forma.

Este percurso não teria sido possível sem a Universidade de Évora, que durante estes anos foi sinónimo de casa e, por isso, quero agradecer pela experiência memorável e pelos conhecimentos e competências adquiridas, que me fizeram crescer tanto a nível pessoal como profissional. Queria também agradecer à comissão de curso e aos docentes que me proporcionaram um percurso académico cheio de aprendizagens.

À minha família, que esteve sempre lá nos momentos não só de conquista, como também de maior adversidade, quero agradecer por todo o amor, por nunca terem deixado de acreditar em mim e nas minhas capacidades, por me apoiarem incondicionalmente e por todas as palavras de conforto e incentivo que marcaram pela diferença esta caminhada. Não poderia também deixar de lembrar uma pessoa que infelizmente já cá não está, mas que sempre me encorajou a ser a melhor versão de mim e a seguir os meus sonhos, a minha avó Maria Jacinta Serol.

Por fim, quero agradecer a todos os meus amigos, aos de longa data e àqueles que fiz ao longo desta etapa, por todo o apoio, por estarem presentes nos momentos mais importantes e por terem tornado estes anos em algo inesquecível. Em particular, ao Pedro Esteves que, não só como namorado, mas também como amigo, foi porto seguro, nunca deixando que eu duvidasse de mim, nem daquilo que era capaz.

Resumo

O nemátode das lesões radiculares *Pratylenchus penetrans* é um endoparasita migratório capaz de infetar várias culturas agrícolas sendo, por isso, considerado um dos mais destrutivos a nível mundial. Atualmente, os pesticidas químicos são a principal metodologia utilizada no controlo dos danos causados por estes fitoparasitas. No entanto, e devido aos problemas associados a esta abordagem de proteção, tornou-se fundamental a procura de sistemas alternativos mais ecológicos que permitam combater esta espécie altamente ameaçadora. Os óleos essenciais de plantas e os compostos bioativos isolados mostraram ter ação nematodocida sendo, portanto, eficientes no controlo deste fitoparasita. Neste sentido, o principal objetivo deste trabalho consiste em avaliar dois compostos orgânicos, nomeadamente o 3-octanol e o benzaldeído, e a sua capacidade de degradação de xenobióticos no nemátode *P. penetrans*. Posteriormente, e para efeitos comparativos, foi avaliada a ação do nematodocida oxamil, princípio ativo de um produto comercial, no metabolismo do nemátode. Para isso, foram realizadas várias tarefas recorrendo a diversas metodologias em que consistem na: i) análise *in silico* de genes envolvidos no metabolismo dos xenobióticos, selecionados a partir do transcriptoma do *P. penetrans* na presença de 3-octanol, benzaldeído e oxamil; ii) validação no genoma e transcriptoma dos genes preditos do *P. penetrans* no metabolismo dos xenobióticos; e iii) estudo da expressão dos genes selecionados no metabolismo dos xenobióticos na presença dos três compostos orgânicos. Os resultados obtidos contribuirão beneficemente para este estudo do modo de ação destes dois compostos no *P. penetrans*.

Palavras-chave

Nematodocida; nemátodes fitoparasitas; benzaldeído; 3-octanol; metabolitos secundários.

Abstract

The root lesion nematode *Pratylenchus penetrans* is a migratory endoparasite capable of infecting various agricultural crops and is considered one of the most destructive worldwide. Currently, chemical pesticides are the main methodology used to control the damage caused by these plant parasites. However, due to the problems associated with this protection approach, it has become essential to search for alternative, more ecological systems that can combat this highly threatening species. Essential oils and isolated bioactive compounds have shown to have nematicidal action and are therefore efficient in controlling this plant parasite. In this sense, the main objective of this work is to evaluate two organic compounds, namely 3-octanol and benzaldehyde, and their capacity to degrade xenobiotics in the nematode *P. penetrans*. Posteriorly, and for comparative purposes, the action of the nematicide oxamyl was evaluated, the active principle of a commercial product, on the nematode metabolism. To this end, several tasks were carried out using different methodologies which consist of: i) *in silico* analysis of genes involved in the metabolism of xenobiotics, selected from the *P. penetrans* transcriptome in the presence of 3-octanol, benzaldehyde and oxamyl; ii) validation of the genome and transcriptome of the predicted genes of *P. penetrans* in the metabolism of xenobiotics; and iii) study of the expression of selected genes in the xenobiotic metabolism in the presence of the three organic compounds. The results obtained will contribute beneficially to the study of the mode of action of these two compounds on *P. penetrans*.

Keywords

Nematocides; plant-parasitic nematodes; benzaldehyde; 3-octanol; secondary metabolites.

Índice geral

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
I. Índice de figuras	vi
II. Índice de tabelas	viii
III. Índice de gráficos	ix
IV. Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos	x
1. Problemática e objetivos	1
1.1. Problemática	1
1.2. Objetivos gerais	2
1.3. Objetivos específicos	2
2. Fundamento teórico	3
2.1. Introdução aos nemátodes fitoparasitas	3
2.1.1. Nemátode das lesões radiculares	4
2.2. Metodologias de controlo de nemátodes fitoparasitas	6
2.3. Interação nemátode-planta: mecanismos gerais de defesa	8
2.3.1. Metabolismo de xenobióticos	10
3. Metodologia	12
3.1. Estratégia	12
3.2. Procedimento Experimental	13
3.2.1. Análise <i>in silico</i> de sequências de genes envolvidos na via metabólica dos xenobióticos	13
3.2.2. Validação dos genes envolvidos na via metabólica dos xenobióticos	14
3.2.2.1. Extração do DNA	14
3.2.2.2. Amplificação dos genes de interesse por PCR	14
3.2.2.3. Eletroforese em gel de agarose	16
3.2.2.4. Purificação dos produtos de PCR, sequenciação e análise de sequências	16

3.2.3. Síntese de cDNA a partir de RNA dos ensaios nematodocidas e validação por qPCR	17
3.2.4. Quantificação relativa dos enzimas do <i>Pratylenchus penetrans</i> por RT-qPCR	18
3.2.5. Tratamento dos resultados	20
3.3. Equipamentos	21
3.4. Reagentes	21
3.5. Diagrama do trabalho	22
4. Resultados e discussão.....	23
4.1. Análise <i>in silico</i> das sequências preditas dos enzimas do <i>Pratylenchus penetrans</i>	23
4.2. Validação dos genes que codificam enzimas do <i>Pratylenchus penetrans</i>	27
4.3. Efeito dos compostos 3-octanol, benzaldeído e oxamil na expressão relativa dos enzimas do <i>Pratylenchus penetrans</i>	29
5. Conclusão.....	33
6. Referências Bibliográficas.....	34
ANEXOS.....	39

I. Índice de figuras

Figura 2.1 - Estrutura bucal dos diferentes níveis tróficos dos nemátodes. Imagem adaptada de Ugarte and Zaborski (2009).....	3
Figura 2.2 - Classificação dos nemátodes fitoparasitas de acordo com o modo de parasitismo. Imagem adaptada de Sato <i>et al.</i> (2019).	4
Figura 2.3 - Ciclo de vida dos nemátodes das lesões radiculares. Imagem adaptada de Jones and Fosu-Nyarko (2014).....	5
Figura 2.4 - Respostas imunitárias das plantas contra os nemátodes fitoparasitas (a verde - mecanismos de defesa PAMPs e DAMPs, e a castanho – mecanismo de defesa ETI). Imagem adaptada de Sato <i>et al.</i> (2019).	9
Figura 2.5 - Metabolismo dos xenobióticos. Imagem adaptada de Matoušková <i>et al.</i> (2016).	11
Figura 3.6 – Gráfico de amplificação. Imagem adaptada de Bio-Rad (2006).	19
Figura 4.7 - Amplificação dos genes que codificam os enzimas a partir de DNA do <i>Pratylenchus penetrans</i> . Na figura (A) encontram-se representadas as bandas correspondentes: gene C4302.17317 (1), gene C4302.20899 (2), controlo negativo (-). Na figura (B) encontram-se representadas as bandas correspondentes: controlo negativo (-), gene C4302.28117 (1), gene C4302.23116 (2), gene C4302.28581 (3), gene C4302.29925 (4). Na figura (C) encontram-se representadas as bandas correspondentes: controlo negativo (-), gene C4302.28117 (1), gene C4302.23116 (2), gene C4302.29925 (3). Na figura (D) encontram-se representadas as bandas correspondentes: controlo negativo (-), gene C4302.30833 (1), gene C4302.28117 (2), gene C4302.20899 (3). Na figura (E) encontram-se representadas as bandas correspondentes: gene C4302.30833 (1), gene C4302.28117 (2), gene C4302.7450 (3) e, controlo negativo (-). Marcador utilizado: 1 Kpb DNA Ladder (BIORON).....	28
Figura 4.8 - Amplificação dos transcritos dos genes que codificam os enzimas do <i>Pratylenchus penetrans</i> . Legenda: cDNA + benz II 1 – C4302.28117 (1), cDNA + ox I 1 – C4302.28117 (2), cDNA + ox II 1 – C4302.28117 (3), cDNA + oct II 1 – C4302.28117 (4), cDNA + H ₂ O II 2 – C4302.28117 (5), cDNA + benz II 1 – C4302.23116 (6), cDNA + ox I 1 – C4302.23116 (7), cDNA + ox II 1 – C4302.23116 (8), cDNA + oct II 1 – C4302.23116 (9), cDNA + H ₂ O II 2 – C4302.23116 (10), cDNA + benz II 1 – C4302.7450 (11), cDNA + ox I 1 – C4302.7450 (12), cDNA + ox II 1 – C4302.7450 (13), cDNA + oct II 1 – C4302.7450 (14), cDNA + H ₂ O II 2 – C4302.7450 (15), controlo negativo (-). Marcador utilizado: 100 pb DNA Ladder (BIORON).....	28

Figura A.1 - Amplificação dos transcritos dos genes que codificam os enzimas do *Pratylenchus penetrans*. Na figura (A) encontram-se representadas as bandas correspondentes: controlo negativo (-), cDNA + benz II 1 – C4302.30833 (1), cDNA + ox I 1 – C4302.30833 (2), cDNA + ox II 1 – C4302.30833 (3), cDNA + oct II 1 – C4302.30833 (4), cDNA + H₂O II 2 – C4302.30833 (5), cDNA + benz II 1 – C4302.20899 (6), cDNA + ox I 1 – C4302.20899 (7), cDNA + ox II 1 – C4302.20899 (8), cDNA + oct II 1 – C4302.20899 (9), cDNA + H₂O II 2 – C4302.20899 (10). Na figura (B) encontram-se representadas as bandas correspondentes: controlo negativo (-), cDNA + benz II 1 – C4302.20899 (1), cDNA + ox I 1 – C4302.20899 (2), cDNA + ox II 1 – C4302.20899 (3), cDNA + oct II 1 – C4302.20899 (4), cDNA + H₂O II 2 – C4302.20899 (5). Na figura (C) encontram-se representadas as bandas correspondentes: controlo negativo (-), cDNA + oct I 1 – C4302.20899 (1), cDNA + benz I 1 – C4302.20899 (2), cDNA + DMSO I 2 – C4302.20899 (3), cDNA + oct I 1 – C4302.30833 (4), cDNA + benz I 1 – C4302.30833 (5), cDNA + DMSO I 2 – C4302.30833 (6), cDNA + oct I 1 – C4302.28117 (7), cDNA + benz I 1 – C4302.28117 (8), cDNA + DMSO I 2 – C4302.28117 (9), cDNA + oct I 1 – C4302.23116 (10), cDNA + benz I 1 – C4302.23116 (11), cDNA + DMSO I 2 – C4302.23116 (12), cDNA + oct I 1 – C4302.7450 (13), cDNA + benz I 1 – C4302.7450 (14), cDNA + DMSO I 2 – C4302.7450 (15).....40

II. Índice de tabelas

Tabela 2.1 - Características dos compostos nematocidas: 3-octanol e benzaldeído. Adaptado de The Metabolomics Innovation Centre [TMIC] (2010a); The Metabolomics Innovation Centre [TMIC] (2010b).	7
Tabela 3.2 - Lista de primers correspondentes aos genes de interesse para PCR e RT-PCR. As sequências dos primers estão na direção 5'-3'.....	15
Tabela 3.3 - Quantificação do RNA total extraído de <i>Pratylenchus penetrans</i> tratados com ddH ₂ O, DMSO (dimetilsulfóxido), oxamil, 3-octanol e benzaldeído e com as respetivas repetições biológicas e técnicas.	18
Tabela 4.4 – Análise in silico dos genes preditos que codificam os enzimas do <i>Pratylenchus penetrans</i>	26
Tabela 4.5 – Resultados do transcriptoma da análise diferencial da expressão dos genes de interesse para os tratamentos 3-octanol e benzaldeído com o solvente DMSO. O símbolo * indica que os resultados não são estatisticamente diferentes com o DMSO.	30
Tabela B.1 - Análise estatística dos ensaios de 3-octanol, com DMSO como tratamento de controlo. Análise de estatística descritiva, análise de variância ANOVA com verificação de pressupostos e teste Post HOC de Tukey. Determinação dos valores de expressão significativos (<i>jamovi 2.3.28</i>).	41
Tabela B.2 - Análise estatística dos ensaios de benzaldeído, com DMSO como tratamento de controlo. Análise de estatística descritiva, análise de variância ANOVA com verificação de pressupostos e teste Post HOC de Tukey. Determinação dos valores de expressão significativos (<i>jamovi 2.3.28</i>).	42
Tabela B.3 - Análise estatística dos ensaios de oxamil, com ddH ₂ O como tratamento de controlo. Análise de estatística descritiva, análise de variância ANOVA com verificação de pressupostos e teste Post HOC de Tukey. Determinação dos valores de expressão significativos (<i>jamovi 2.3.28</i>).	43

III. Índice de gráficos

Gráfico 4.1 - Comparação da expressão relativa dos genes que codificam enzimas do *Pratylenchus penetrans* relativamente ao gene de referência actina no ensaio de 3-octanol (A), benzaldeído (B) e oxamil (C). Símbolos no topo das colunas indicam diferenças significativas, *p < 0,05 **p < 0,01 ***p < 0,001.32

IV. Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

aa – *Amino Acid* (aminoácido)

ABC – *ATP-Binding Cassette* (transportadores de cassetes de ligação ao ATP)

ATP – *Adenosine triphosphate* (adenosina trifosfato)

pb – Pares de Base

cDNA – *Complementary DNA* (DNA complementar)

C_T – *Cycle threshold* (limite inferior detetável)

CYPs – *Cytochromes* (citocromos)

DAMPs – *Damage Associated Molecular Patterns* (padrões moleculares associados a danos)

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

EPHXs – *Epoxide hydrolases* (epóxido hidrolases)

ETI – *Efector Triggered Immunity* (imunidade desencadeada por efetores)

gDNA – *Genomic DNA* (DNA genómico)

GSH – *Glutathione* (glutationo)

GSTs – *Glutathione S-transferases* (glutationo S-transferases)

KDa – Kilodalton

Kpb – Kilo pares de base

MAPKs – *Mitogen-Activated Protein Kinases* (proteínas quinases ativadas por mitógeno)

mRNA – *Messenger ribonucleic acid* (RNA mensageiro)

NLRs – Nemátode das lesões radiculares

PAMPs – *Pathogen Associated Molecular Patterns* (padrões moleculares associados a agentes patogénicos)

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia polimerase)

qPCR – *Quantitative Polymerase Chain Reaction* (PCR quantitativo)

RNA – *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

ROS – *Reactive Oxygen Species* (espécies reativas de oxigénio)

RT – *Reverse Transcriptase* (transcriptase reversa)

RT-qPCR – *Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction* (PCR em tempo real)

SDH – *Succinate dehydrogenase* (succinato desidrogenase)

SDRs – *Short chain dehydrogenases/reductases* (desidrogenases/reduases de cadeia curta)

TCA – *Citric acid cycle* (ciclo do ácido cítrico)

T_a – Temperatura de *annealing*

T_m – Temperatura de *melting*

UDP-UGTs – *UDP-glucuronosyltransferases* (UDP- glucuronosiltransferases)

1. Problemática e objetivos

1.1. Problemática

Como consequência do aumento da densidade populacional ao longo dos anos, a prática agrícola tem vindo a ser intensificada para que a produtividade das culturas satisfaça as necessidades populacionais. Com base nisto, e devido aos diferentes stresses bióticos e abióticos que ameaçam a sustentabilidade das práticas agrícolas (como exemplo, stress hídrico, alterações climáticas e agentes patogénicos), é fundamental desenvolver estratégias de proteção que permitam a produtividade das culturas afetadas.

Os nemátodes fitoparasitas são vistos como uma das maiores pragas agrícolas, devido à sua elevada capacidade de provocar danos nas plantas hospedeiras. O *Pratylenchus penetrans* é um nemátode das lesões radiculares (NLRs) que, como resultado da sua alimentação e ciclo de vida, causa lesões nas raízes das plantas. Este endoparasita migratório é considerado um dos mais destrutivos, sendo em Portugal, a planta da batateira uma das culturas mais afetadas pelo mesmo. Posto isto, e devido ao grande impacto que este fitoparasita provoca na economia mundial agrícola, é necessário que se encontrem estratégias que reduzam a dispersão do mesmo e contribuam para o controlo dos danos causados.

As abordagens convencionais têm demonstrado pouca eficácia no combate aos NLRs, colocando também em risco os meios de cultura envolventes. O método mais utilizado para controlo destas pragas consiste no uso de pesticidas químicos, no entanto, estes constituem um elevado risco para a saúde e ambiente sendo, por isso, necessário desenvolver estratégias alternativas mais ecológicas. Com base em estudos realizados, verificou-se que os óleos essenciais de plantas, bem como compostos bioativos isolados, constituíam benefícios no controlo dos nemátodes fitoparasitas, sendo a sua utilização mais segura.

No seguimento do trabalho de Barbosa *et al.* (2024) foram selecionados compostos orgânicos nematodocidas nomeadamente, o 3-octanol e o benzaldeído, que evidenciaram ter um efeito mortal contra *P. penetrans*, com o intuito de se estudar o metabolismo de degradação de xenobióticos do nemátode. Resultados promissores poderão contribuir de forma benéfica para o controlo deste parasita na medida em que se poderá desenvolver uma estratégia que minimize este problema enfrentado pelo setor agrícola.

1.2. Objetivos gerais

Entender o modo de ação dos compostos nematodocidas permitirá desenvolver nematodocidas de nova geração, mais específicos e eficientes, com menor impacto noutros organismos (como por exemplo, os nemátodes de vida livre que coabitam a rizosfera das plantas e são benéficos para o meio ambiente). O objetivo geral deste trabalho consiste em compreender o modo/mecanismo de ação dos compostos nematodocidas no *P. penetrans*.

1.3. Objetivos específicos

Conhecer e compreender:

- A importância do controlo dos nemátodes fitoparasitas no setor agrícola;
- Os métodos de proteção de culturas agrícolas usados no controlo dos nemátodes fitoparasitas e a importância de desenvolver estratégias alternativas mais ecológicas;
- Os mecanismos gerais de defesa das plantas face à infeção provocada pelos nemátodes;
- O metabolismo dos xenobióticos e os principais enzimas envolvidas;
- O impacto do *Pratylenchus penetrans* na agricultura e o seu mecanismo de ação;
- O modo de ação dos compostos 3-octanol, benzaldeído e oxamil no *Pratylenchus penetrans*;
- Análise bioinformática de sequências;
- As técnicas de biologia molecular: extração de DNA e RNA, amplificação de genes por PCR, síntese de cDNA e quantificação da expressão relativa dos enzimas por RT-qPCR.

Dar valor:

- Ao estudo da expressão de genes potencialmente envolvidos no metabolismo dos xenobióticos;
- Aos compostos utilizados neste estudo: 3-octanol, benzaldeído e oxamil.

Aplicar:

- Técnicas de biologia molecular;
- Conhecimentos de análise bioinformática;
- Conhecimentos de análise estatística;
- Regras e normas a ter no laboratório de nematologia e biologia molecular.

2. Fundamento teórico

2.1. Introdução aos nemátodes fitoparasitas

Os nemátodes são organismos multicelulares mais numerosos no solo e pertencem à mesofauna do mesmo, encontrando-se nas películas de água entre as partículas do solo (Magnusson, 2020; Ribeiro *et al.*, 2023). Estes apresentam um tamanho pequeno e um corpo geralmente alongado revestido por uma cutícula permeável e flexível não segmentada (Orgiazzi *et al.*, 2016). Estes organismos podem ser classificados consoante o tipo de alimentação em: bacterívoros (bactérias), fungívoros (fungos), omnívoros, predadores e parasitas de plantas (Figura 2.1) (Ribeiro *et al.*, 2023).

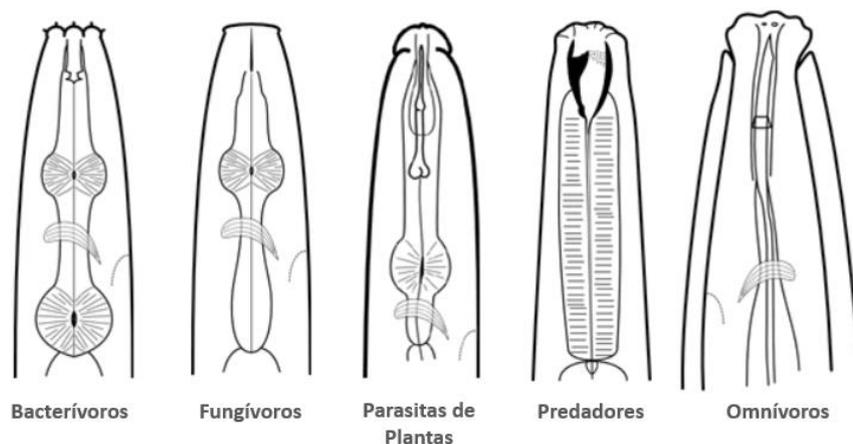


Figura 2.1 - Estrutura bucal dos diferentes níveis tróficos dos nemátodes. Imagem adaptada de Ugarte and Zaborski (2009).

Os nemátodes fitoparasitas constituem uma grande ameaça ao ecossistema do solo uma vez que provocam danos extensíveis nas plantas afetando drasticamente o seu metabolismo e crescimento (Poveda *et al.*, 2020; El-Saadony *et al.*, 2021). A sua elevada capacidade de obtenção de alimento, juntamente com a sua facilidade de adaptação aos meios e climas envolventes, constitui uma das principais razões que tornam os nemátodes fitoparasitas uma das pragas agrícolas mais devastadoras a nível mundial (Orgiazzi *et al.*, 2016; Sato *et al.*, 2019). Atualmente conhecem-se mais de 4100 espécies de nemátodes parasitas de plantas, responsáveis por infetar um vasto número de culturas de interesse económico. Estima-se que os danos associados aos mesmos causem um prejuízo de 173 mil milhões de dólares anuais (Phani *et al.*, 2021). O ciclo de vida destes varia consoante a espécie e está dependente das condições de parasitismo de cada um, podendo ser classificados como: ectoparasitas, semi-endoparasitas e endoparasitas; e parasitas sedentários e migratórios (Figura 2.2) (Palomares-Rius *et al.*, 2017). O que difere um

ectoparasita de um endoparasita é a forma como estes se alimentam da planta hospedeira, sendo que os primeiros ficam no exterior da planta, alimentando-se da mesma através da penetração do estilete (órgão do nemátode situado na estrutura bucal que permite perfurar as células, para que desta forma possam migrar na planta e alimentarem-se), enquanto os segundos entram completamente na raiz do hospedeiro e alimentam-se dos seus tecidos (Palomares-Rius *et al.*, 2017; Magnusson, 2020). Os semi-endoparasitas alimentam-se da planta durante um momento do seu ciclo de vida, após penetrarem parcialmente na mesma (Palomares-Rius *et al.*, 2017). Os parasitas migratórios permanecem móveis ao longo da sua vida ao contrário dos nemátodes sedentários que apenas têm um estágio no qual se movimentam, sendo este o segundo estágio (Sato *et al.*, 2019).

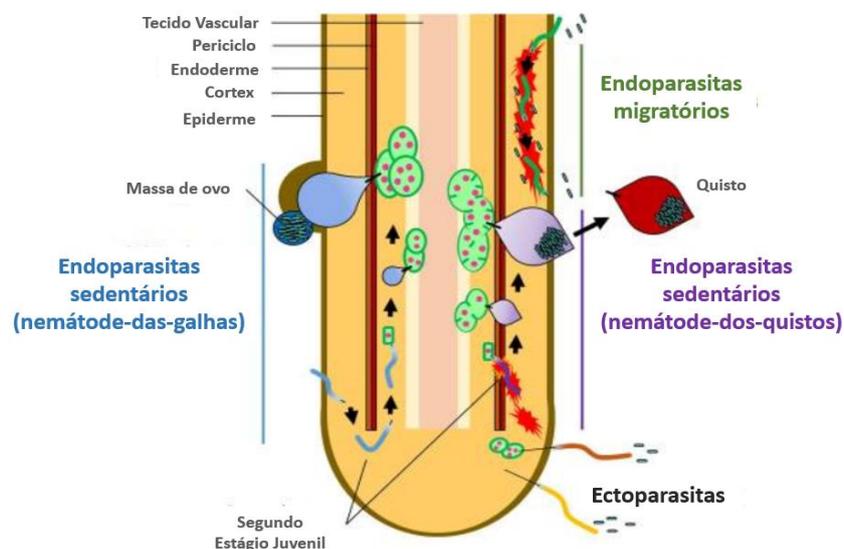


Figura 2.2 - Classificação dos nemátodes fitoparasitas de acordo com o modo de parasitismo. Imagem adaptada de Sato *et al.* (2019).

As três espécies de nemátodes fitoparasitas que constituem uma maior ameaça a nível mundial para as culturas agrícolas com maior interesse económico são: os nemátodes das galhas, os nemátodes dos quistos e os nemátodes das lesões radiculares (Castillo and Vovlas, 2007). Estes últimos ocupam o terceiro lugar na classificação mundial, sendo o género *Pratylenchus penetrans* aquele que afeta um maior número de plantas originando, desta forma, perdas económicas consideráveis (Vicente *et al.*, 2021).

2.1.1. Nemátode das lesões radiculares

Estudos taxonómicos recentes indicam a existência de 101 espécies de nemátodes das lesões radiculares distribuídas pelo mundo (Orlando *et al.*, 2020). Este grupo de nemátodes constitui uma ameaça para várias plantas e, dependendo da espécie, podem infetar vários hospedeiros, como por exemplo culturas agrícolas, cereais, plantas ornamentais

e culturas industriais (Castillo and Vovlas, 2007). Os NRLs são responsáveis por causar lesões nas raízes das plantas hospedeiras, como resultado da sua alimentação e desenvolvimento do seu ciclo de vida afetando, assim, o crescimento da mesma (Jones *et al.*, 2013; Vicente *et al.*, 2021). Como consequência da penetração do nemátode, o crescimento radicular da planta é afetado, provocando uma diminuição do seu tamanho (Vicente *et al.*, 2021). As raízes começam por apresentar lesões acastanhadas, podendo levar à necrose dos tecidos ou até mesmo à sua completa destruição (Fosu-Nyarko and Jones, 2016). Na parte aérea da planta lesionada, os sintomas costumam manifestar-se através de clorose e redução do crescimento, sendo estes geralmente confundidos com murchidão derivada de stress hídrico e/ou problemas associados ao déficit de nutrição (Vicente *et al.*, 2021). As condições edafoclimáticas adversas (como exemplo, temperatura, humidade, solo) constituem também uma ameaça para a planta, podendo agravar os sintomas desenvolvidos na parte aérea da mesma (Vicente *et al.*, 2021).

Os NLRs são considerados endoparasitas migratórios, intracelulares e, normalmente apresentam um ciclo de vida de 3 a 9 semanas (Jones and Fosu-Nyarko, 2014). Este é constituído por seis estágios de desenvolvimento, iniciando-se o mesmo ainda dentro do ovo e passando para as quatro fases juvenis (J1, J2, J3 e J4), que antecedem a fase adulta (Figura 2.3) (Vicente *et al.*, 2021). O desenvolvimento do ovo compreende dois estados, J1 e J2. Neste último estado, o nemátode eclode e passa a movimentar-se, podendo ser encontrado na superfície radicular da planta hospedeira ou no seu interior (Vicente *et al.*, 2021). A partir deste estado até a fase adulta, o nemátode pode entrar e sair dos tecidos radiculares, de forma a alimentar-se de células epidérmicas e corticais da raiz (Fosu-Nyarko and Jones, 2016).

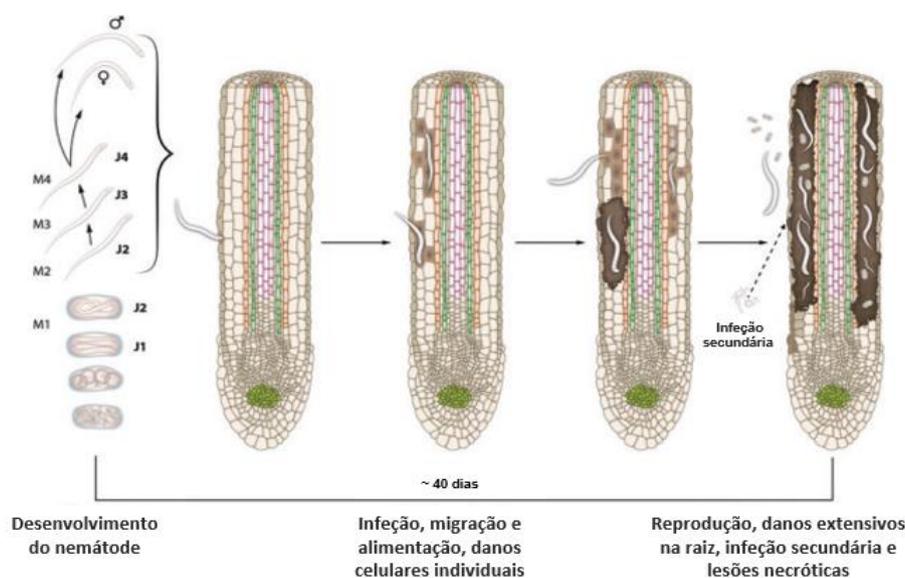


Figura 2.3 - Ciclo de vida dos nemátodes das lesões radiculares. Imagem adaptada de Jones and Fosu-Nyarko (2014).

A sua reprodução costuma ser assexuada por partenogénese, no entanto, alguns géneros de nemátodes reproduzem-se sexualmente, como é o caso do nemátode *P. penetrans* (Magnusson, 2020). O fitoparasita *P. penetrans* é considerado um dos mais destrutivos NLRs devido ao elevado número de plantas hospedeiras que consegue infetar e à sua capacidade para se adaptar a diferentes condições climáticas (Castillo and Vovlas, 2007; Vicente *et al.*, 2021). Este nemátode é responsável por danificar várias culturas agrícolas, sendo em Portugal, a planta da batata (*Solanum tuberosum*) uma das mais afetadas (Esteves *et al.*, 2015).

2.2. Metodologias de controlo de nemátodes fitoparasitas

Os métodos de proteção de culturas agrícolas usados no controlo dos danos provocados pelos nemátodes está dependente da espécie e da quantidade dos mesmos presentes no solo (Vicente *et al.*, 2021). Estes fitoparasitas adquirem estratégias de proteção quando sujeitos a condições adversas à sua sobrevivência, sendo a criptobiose um desses processos que faz interromper o seu metabolismo até condições favoráveis, dificultando assim o seu processo de eliminação (El-Saadony *et al.*, 2021).

O controlo dos NLRs é geralmente efetuado com recurso ao uso de não fumigantes e fumigantes de solo, destes últimos destacam-se a cloropicrina, o brometo de metilo, o dazomet e o 1,3-dicloropropeno (Orlando *et al.*, 2020). Os pesticidas não fumigantes consistem em nematodocidas com baixo peso molecular, constituídos essencialmente por organofosfatos (Castillo and Vovlas, 2007). No entanto, atualmente, foi proibido o uso da maioria destas substâncias, uma vez que manifestaram grandes preocupações a nível ambiental e de segurança na saúde (Orlando *et al.*, 2020). Desta forma, e apesar do uso de pesticidas químicos ser o método mais utilizado para minimizar a dispersão destes fitoparasitas, é necessário que se encontre e desenvolva outras abordagens ecológicas, menos dispendiosas e prejudiciais à saúde humana (Chitwood, 2002; Barbosa *et al.*, 2022).

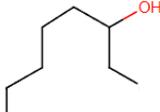
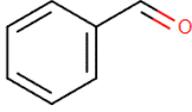
De acordo com estudos realizados que visam o uso de compostos naturais para combate a nemátodes fitoparasitas, verificou-se que os óleos essenciais apresentam várias vantagens que tornam a sua utilização benéfica contra estes parasitas (Barbosa *et al.*, 2012). Estes compostos naturais apresentam uma alta atividade biológica, não afetam o meio ambiente, apresentam uma abordagem de utilização mais segura e já foram aplicados com sucesso contra importantes pragas de nemátodes, pelo que são considerados produtos de eleição no combate destes organismos em plantas (Faria *et al.*, 2021).

No trabalho de Barbosa *et al.* (2024) foi avaliada a atividade nematodocida de vários fitoquímicos contra o *P. penetrans*, através de bioensaios de contacto direto e indireto. Dois dos compostos estudados foram o 3-octanol e o benzaldeído, revelaram ser fitoquímicos com

maior atividade no combate a este nemátode das lesões radiculares. Para além destes, foi também avaliada a atividade do composto oxamil, que é um nematocida sintético. Foram realizadas análises aos parâmetros de toxicidade, análises microscópicas para observar as alterações na morfologia dos nemátodes quando submetidos aos diferentes tratamentos e avaliação da segurança ambiental face aos compostos aplicados (Barbosa *et al.*, 2024). Os compostos 3-octanol e benzaldeído manifestaram ter resultados promissores, nos quais foi observada uma elevada taxa de mortalidade do nemátode *P. penetrans*. Devido às suas vantagens ecológicas e de baixa toxicidade para mamíferos foram considerados fortes nematocidas no combate ao nemátode em estudo (Barbosa *et al.*, 2024). Já o oxamil, quando comparado a estes dois fitoquímicos, revelou possuir uma atividade nematocida inferior e características mais prejudiciais, tanto para o ambiente, como para a saúde (Barbosa *et al.*, 2024).

No seguimento do projeto de investigação PratyOmics (PTDC/ASP-PLA/0197/2020), que visa o desenvolvimento de estratégias mais ecológicas de controlo de nemátodes fitoparasitas, pretende-se avaliar a capacidade de degradação de xenobióticos do NLR *P. penetrans* através do uso de dois compostos nematocidas, o 3-octanol e o benzaldeído (Tabela 2.1). O 3-octanol é um composto orgânico pertencente à classe dos álcoois alifáticos e as suas plantas de origem são da família *Lamiaceae* e *Asparagaceae* (The Metabolomics Innovation Centre [TMIC], 2010a). O composto benzaldeído é um aldeído aromático e consiste num líquido incolor que apresenta um odor característico de amêndoa. Este composto é originário de plantas da família *Gramineae* e *Cucurbitaceae* (The Metabolomics Innovation Centre [TMIC], 2010b).

Tabela 2.1 - Características dos compostos nematocidas: 3-octanol e benzaldeído. Adaptado de *The Metabolomics Innovation Centre [TMIC] (2010a); The Metabolomics Innovation Centre [TMIC] (2010b)*.

Composto	Fórmula química	Classificação	Estrutura química	Origem (famílias)
3-octanol	C ₈ H ₁₈ O	álcool alifático		<i>Lamiaceae</i> <i>Asparagaceae</i>
Benzaldeído	C ₇ H ₆ O	aldeído aromático		<i>Gramineae</i> <i>Cucurbitaceae</i>

2.3. Interação nemátode-planta: mecanismos gerais de defesa

Como forma de se protegerem contra organismos patogênicos e assegurarem a sua sobrevivência, as plantas desenvolveram respostas imunitárias, cujo seu conjunto é conhecido como um processo de imunidade inata (Cui *et al.*, 2015). Para isso, as plantas recorrem a dois mecanismos de defesa distintos: i) percepção de padrões moleculares associados a agentes patogênicos (*Pathogen Associated Molecular Patterns*, PAMPs) ou padrões moleculares associados a danos (*Damage Associated Molecular Patterns*, DAMPs) provenientes dos recetores nas células vegetais; ii) reconhecimento direto ou indireto de efetores patogênicos (moléculas secretadas pelo nemátode, com diferentes funções na planta, que permitem a sua infeção), levando a um tipo de imunidade desencadeada por imunidade provocada por efetores (*Efector Triggered Immunity*, ETI) (Figura 2.4) (Zipfel, 2008; Sato *et al.*, 2019).

As respostas intracelulares associadas ao primeiro mecanismo de defesa, que constitui a resistência pré-penetração, incluem o reforço da parede celular das plantas e a produção de diferentes compostos de modo a controlarem a infeção e impedirem a sua progressão (Figura 2.4) (Zipfel, 2008; Kliebenstein, 2012). As barreiras físicas existentes na planta constituem a primeira linha de defesa, impedindo que organismos não adaptados (como os nemátodes fitoparasitas) consigam ultrapassar as mesmas e infetar a cultura (Cui *et al.*, 2015). A parede celular constitui a sua principal barreira física, sendo esta composta por estruturas e polissacáridos ligados entre si maioritariamente por ligações não covalentes (Fosu-Nyarko and Jones, 2016). Das várias substâncias produzidas pelas plantas contra estes fitoparasitas destacam-se: a secreção de enzimas, a produção de compostos com ação nematodocida (como exemplo, a produção de metabolitos secundários e/ou a secreção de agentes repelentes que reduzem a atratividade da raiz) e a libertação de espécies reativas de oxigénio (*Reactive Oxygen Species*, ROS) e óxido nítrico (Figura 2.4) (Sato *et al.*, 2019). Conforme a alteração manifestada pela célula hospedeira, são secretadas moléculas padrão que vão posteriormente ser reconhecidas por recetores transmembranares (Lee *et al.*, 2017). No caso dos nemátodes fitoparasitas, estes libertam feromonas, mais especificamente ascarídeos, para a rizosfera que vão induzir o desencadeamento de uma resposta imunitária por parte da planta hospedeira (Manohar *et al.*, 2020).

A imunidade desencadeada pelos efetores, conhecida como resistência pós-penetração, costuma estar associada à morte celular e é conhecida por resposta de hipersensibilidade (Figura 2.4) (Zipfel, 2008). Esta ocorre após o nemátode conseguir penetrar a planta com a ajuda do estilete e secretar moléculas efetoras de virulência que podem ser enzimas que destroem a parede celular do hospedeiro e outras moléculas com diferentes funções no parasitismo (Khan and Khan, 2021). Este mecanismo imunitário funciona através

de processos inibitórios que impossibilitam, por exemplo, a formação e desenvolvimento de células de alimentação necessárias à sobrevivência do nemátode no caso dos nemátodes fitoparasitas sedentários, e a migração dos nemátodes semi- ou endoparasitas dificultando, assim, a conclusão do seu ciclo de vida (Sato *et al.*, 2019).

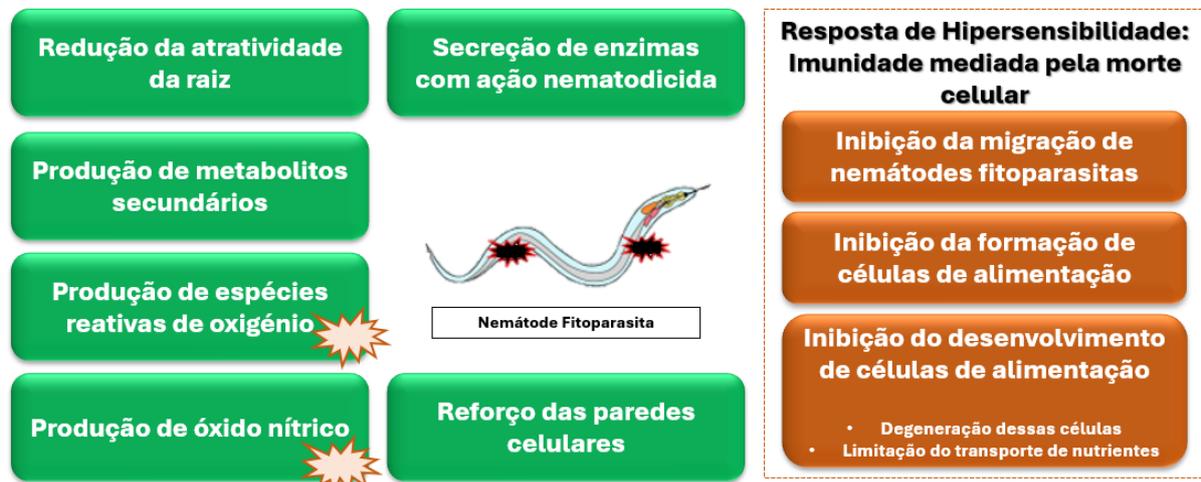


Figura 2.4 - Respostas imunitárias das plantas contra os nemátodes fitoparasitas (a verde - mecanismos de defesa PAMPs e DAMPs, e a castanho – mecanismo de defesa ETI). Imagem adaptada de Sato *et al.* (2019).

As reações envolvidas na resposta das plantas à infecção pelo agente patogénico envolvem a produção de ROS e cascatas de fosforilação de proteínas quinases ativadas por mitógeno (*Mitogen-Activated Protein Kinases*, MAPKs) (Buscaill and Rivas, 2014). As ROS fornecem uma maior resistência à planta na medida em que fortalecem as paredes celulares da mesma (Holbein *et al.*, 2016) e as cascatas de MAPKs são fundamentais na regulação de substratos citoplasmáticos e nucleares que asseguram diversos processos biológicos (Mohanta *et al.*, 2015). O mecanismo de defesa ETI dificulta o modo de sobrevivência do fitoparasita devido à produção de compostos tóxicos (como exemplo, metabolitos secundários) através de reações que ocorrem nas células e nos tecidos das plantas que impedem que o mesmo consiga alimentar-se (Jibril *et al.*, 2016; Desmedt *et al.*, 2020; Khan and Khan, 2021). Os metabolitos secundários são compostos biossintéticos derivados da alteração de vias metabólicas e enzimas do metabolismo primário que, apesar de não serem necessários para o crescimento e desenvolvimento da planta, fornecem-lhe proteção contra diversos estímulos biológicos (Pott *et al.*, 2019; Patil, 2020). Dependendo do estímulo, a planta produz um determinado metabolito secundário, sendo que grande parte destes são derivados de compostos fenólicos (Gillet *et al.*, 2017; Anjali *et al.*, 2023). Os flavonóides e o ácido clorogénico são exemplos de metabolitos secundários libertados pelas plantas após uma ameaça patogénica, de forma a assegurar a resistência da cultura hospedeira (Chin *et al.*, 2018; Khan and Khan, 2021).

2.3.1. Metabolismo de xenobióticos

Num organismo vivo, é possível ser encontrado produtos químicos que não são produzidos pelo mesmo, nem fazem parte do seu metabolismo. A este tipo de compostos atribuiu-se o nome de xenobióticos (Štefanac *et al.*, 2021). De maneira a conferir proteção ao organismo, os seres vivos criaram sistemas de destoxificação contra xenobióticos, metabolizando-os em compostos hidrofílicos para depois poderem ser excretados (Matoušková *et al.*, 2016). O metabolismo é capaz de influenciar o tempo de meia vida de um determinado composto, a sua atividade biológica e a duração da mesma, sendo, portanto, considerado um fator determinante no nível de toxicidade de um composto e na sua excreção (Timbrell, 2009).

O metabolismo dos xenobióticos compreende duas etapas: a biotransformação e o transporte no organismo (Figura 2.5) (Matoušková *et al.*, 2016). Numa primeira etapa são usados enzimas metabólicos, com diferentes localizações subcelulares, para efetuar a biotransformação de um composto orgânico, suprimindo, modificando ou adicionando-lhe grupos funcionais que permitam aumentar a polaridade, o peso e o tamanho da molécula, tornando o substrato mais reativo (Lindblom and Dodd, 2006; Hartman *et al.*, 2021). Apesar do retículo endoplasmático liso ser o local onde se localizam a maioria dos enzimas desta etapa, alguns deles podem também ser encontrados no citoplasma ou nas mitocôndrias (Timbrell, 2009). Este processo envolve duas fases distintas, sendo que a primeira fase só ocorre se o composto não possuir um grupo funcional adequado para se prosseguir com a segunda fase (Ioannides, 2001). Na primeira fase ocorrem reações de oxidação, redução e hidrólise, nas quais entram enzimas específicos como é o caso dos citocromos P450 (*Cytochromes P450*, CYP450), das desidrogenases/reduções de cadeia curta (*short chain dehydrogenases/reductases*, SDRs) e dos enzimas epóxido hidrolases (*epoxide hydrolases*, EPHXs) (Williams *et al.*, 2000; Matoušková *et al.*, 2016; Gillet *et al.*, 2017). Os citocromos P450 são considerados os principais enzimas desta fase, uma vez que são responsáveis por metabolizar vários substratos endógenos e exógenos (Matoušková *et al.*, 2016). Estes enzimas são monooxigenases que se encontram no retículo endoplasmático e efetuam a maior parte das reações de oxidação desta primeira fase (Hartman *et al.*, 2021). O sistema enzimático CYP450 é composto por uma família de isoenzimas que contêm um grupo prostético hemo (Timbrell, 2009). Os enzimas epóxido hidrolases, situados também no retículo endoplasmático, desempenham um papel fundamental no metabolismo adicional de epóxidos que são gerados pela oxidação dependente do CYP450 (Williams *et al.*, 2000). A segunda fase inclui reações de conjugação dos xenobióticos ou dos seus metabolitos com compostos endógenos (como exemplo, derivados glucídicos, glutatióno (*glutathione*, GSH), aminoácidos e compostos inorgânicos), permitindo aumentar a solubilidade de forma a facilitar a excreção

(Matoušková *et al.*, 2016; Hartman *et al.*, 2021). O mecanismo envolvido implica que se forme um intermediário de alta energia, para que ocorra a ativação tanto do xenobiótico, como do metabolito endógeno (Timbrell, 2009). As reações envolvidas podem ser de glucuronidação, conjugação com o glutathione ou com aminoácidos, e são catalisadas, respetivamente, pelos enzimas UDP-glucuronosiltransferases (*UDP-glucuronosyltransferases*, UDP-UGTs), glutathione *S*-transferases (*glutathione S-transferases*, GSTs) e β -liases (Timbrell, 2009). As UDP-glucuronosiltransferases estão localizadas no retículo endoplasmático e são responsáveis por catalisar ligações covalentes de hexoses a produtos químicos lipofílicos (Lindblom and Dodd, 2006; Matoušková *et al.*, 2016). Podem ainda ocorrer reações de conjugação com compostos simples através de reações de acetilação, metilação e sulfatação (Timbrell, 2009). A segunda etapa consiste no transporte ativo dos metabolitos conjugados resultantes da etapa anterior, para o exterior da membrana da célula (Matoušková *et al.*, 2016). Este transporte é efetuado a partir de proteínas de transporte, como é o caso dos transportadores de cassetes de ligação ao ATP (*ATP-Binding Cassette*, ABC) (Gillet *et al.*, 2017).

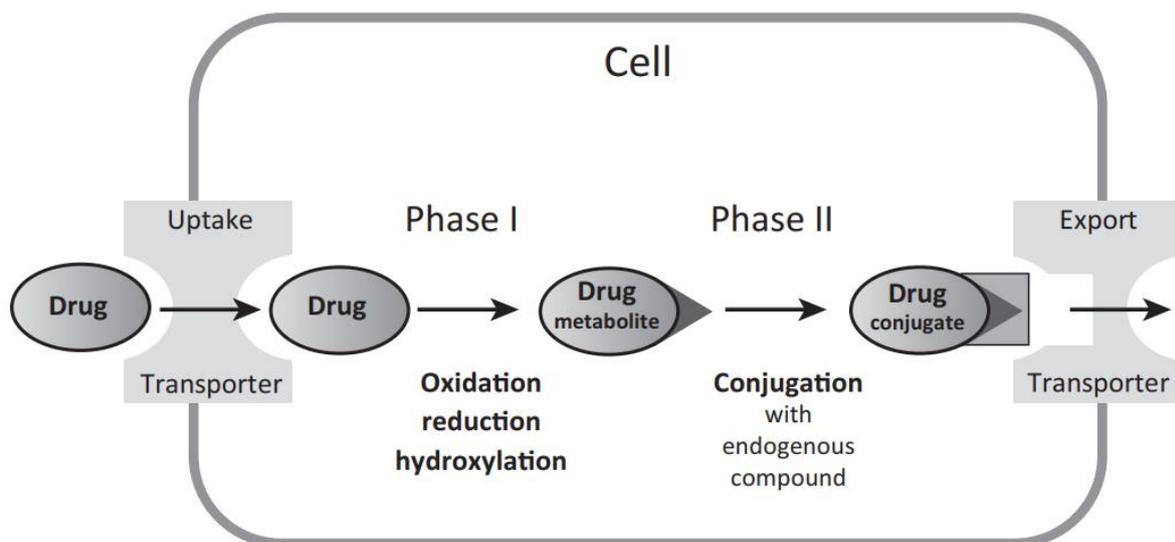


Figura 2.5 - Metabolismo dos xenobióticos. Imagem adaptada de Matoušková *et al.* (2016).

A produção de metabolitos secundários pelas plantas são um exemplo de xenobióticos para os nemátodes, sendo que a sua absorção ocorre maioritariamente por ingestão, e através da cutícula, cuja composição em colagénio protege contra xenobióticos (Gillet *et al.*, 2017 ; Xiong *et al.*, 2017; Hartman *et al.*, 2021).

3. Metodologia

3.1. Estratégia

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

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

Duração: 1 semestre letivo.

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

Ensaio:

- Validação no genoma e transcriptoma do *P. penetrans* dos genes preditos no metabolismo dos xenobióticos;
- Estudo da expressão dos genes do metabolismo dos xenobióticos na presença de 3-octanol, benzaldeído e oxamil.

Parâmetros analisados:

- Análise bioinformática de sequências nucleótidas e proteicas;
- Quantificação da concentração de DNA (*deoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico) e RNA (*ribonucleic acid*, ácido ribonucleico);
- Amplificação de genes de interesse por PCR (*Polymerase Chain Reaction*, reação em cadeia polimerase);
- Análise da expressão relativa por RT-qPCR (*Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction*, PCR em tempo real).

Técnicas utilizadas:

- Extração de DNA;
- Análise de ácidos nucleicos por fluorometria;
- Amplificação de genes por PCR;
- Eletroforese em gel de agarose;
- Purificação de produtos de PCR;
- Análise de sequências obtidas por sequenciação *Sanger*;
- Extração de RNA e síntese de cDNA (*Complementary DNA*, DNA complementar);
- Avaliação da expressão relativa de genes por RT-qPCR.

3.2. Procedimento Experimental

3.2.1. Análise *in silico* de sequências de genes envolvidos na via metabólica dos xenobióticos

Uma lista de sequências de genes potencialmente envolvidos na degradação de xenobióticos, foi obtida a partir de uma versão *in-house* do genoma (Vieira *et al.*, dados não publicados), e do transcriptoma do *P. penetrans* em contacto com os compostos bioativos em estudo (Vicente *et al.*, dados não publicados) (Tabela 3.2). As sequências nucleótidas (gDNA (*Genomic DNA*, DNA genómico) e cDNA) destes genes foram analisadas em diversas bases de dados. Os *primers* foram desenhados manualmente com recurso às ferramentas bioinformáticas NCBI *Primer-BLAST* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>; Altschul *et al.*, 1990) e *Tm calculator* no *Thermo Fisher Scientific* ([Tm Calculator | Thermo Fisher Scientific - PT](https://www.thermo.com/pt/Products/Software/Calculators/Primer-Tm-Calculator)). O alinhamento das sequências de gDNA com o cDNA, por complementaridade, foi efetuado através do programa “CLC Sequence Viewer 8” (QIAGEN) e, posteriormente, utilizou-se o *software* online “*Exon-intron Graphic Maker*” (<http://wormweb.org/exonintron>) para a representação gráfica de exões-intrões. Estas duas ferramentas permitiram a análise da estrutura exão-intrão e, desta forma, a validação das sequências de DNA. Com recurso à base de dados bioinformática NCBI *BLASTx* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; Altschul *et al.*, 1990) foi efetuada uma identificação por similaridade das sequências de gDNA e cDNA, na qual se restringiu ao nível taxonómico “*Nematoda*” e, posteriormente, efetuou-se uma análise predita da sequência de aminoácidos utilizando a ferramenta EXPASY (<https://www.expasy.org/>; Gasteiger, 2003). Após ter sido efetuada a predição mencionada anteriormente, foi realizada uma análise de identificação da similaridade da sequência de aminoácidos e, para isso, utilizaram-se as bases de dados NCBI *BLASTp* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; Altschul *et al.*, 1990), *Uniprot* (<https://www.uniprot.org>) e *Wormbase* (<https://parasite.wormbase.org/index.html>; Howe *et al.*, 2017). A ferramenta *Translate* da EXPASY (<https://web.expasy.org/translate/>; Gasteiger, 2003) permitiu realizar a tradução da sequência de aminoácidos para uma sequência de proteínas e, para esta última foi efetuada uma predição quanto à presença de sinal peptídico através do *software* *SignalP 6.0* (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>; Teufel *et al.*, 2022). Por fim, determinou-se o ponto isoelétrico e a massa molecular da proteína com recurso ao *software* *Peptide mass* da EXPASY (https://web.expasy.org/compute_pi/; <https://www.expasy.org/resources/peptidemass>; Gasteiger, 2003).

3.2.2. Validação dos genes envolvidos na via metabólica dos xenobióticos

3.2.2.1. Extração do DNA

De forma a proceder-se à extração de DNA do nemátode *P. penetrans* recorreu-se ao kit de extração *NZY Tissue gDNA Isolation kit* (NZYTech, Portugal). Primeiramente foi necessário realizar uma homogeneização das suspensões de nemátodes, uma vez que estes fitoparasitas possuem cutícula. Para que isso ocorresse, colocou-se a amostra num tubo O-Ring juntamente com uma esfera metálica e homogeneizou-se 3 vezes durante 6 s em speed 3 no homogeneizador *Mini Bead Mill* (VWR). Seguidamente, centrifugou-se a amostra de modo a remover o conteúdo que ficou nas paredes dos tubos utilizando a centrífuga *Mini* (Scanspeed) e colocou-se a mesma num tubo de 1,5 mL. Posteriormente, e a fim de se proceder à lise celular, adicionou-se 180 µL do Buffer NT1 (reagente do kit) e, após se homogeneizar o conteúdo utilizando o vortex, colocou-se 25 µL de Proteinase K (reagente do kit) para que as proteínas fossem degradadas. Homogeneizou-se a mistura no vortex e incubou-se a mesma no termobloco de banho seco *Thermomixer compact* (Eppendorf) a 56°C, durante cerca de 2:30 h, com agitação de 350 rpm. Após terminar o processo, adicionou-se 200 µL de Buffer NL e homogeneizou-se a mistura durante 10 s no vortex. Adicionou-se 210 µL de etanol 100% (v/v) à amostra e tornou-se a homogeneizá-la no vortex. Inseriu-se em tubos de recolha de 2 mL, uma coluna fornecida pelo kit, transferiu-se a amostra para a mesma e levou-se a centrifugar a 12 300 g durante 1 min. Descartou-se o sobrenadante, colocou-se novamente a coluna no tubo de 2 mL e adicionou-se 500 µL de Buffer NW1 (reagente do kit). Centrifugou-se a amostra a 12 300 g durante 1 min e o processo repetiu-se, mas desta vez usando 500 µL de Buffer NW2 (reagente do kit). Efetuou-se ainda uma outra centrifugação a seco durante 2 min a 12 300 g, para retirar o etanol e os resíduos que ainda pudessem estar presentes na coluna. Por fim, e como forma de eluir o gDNA da coluna, colocou-se a mesma num tubo de 1,5 mL e adicionou-se 25 µL do Buffer NE diretamente na membrana da coluna. Deixou-se repousar durante 1 min e levou-se a centrifugar a 12 300 g durante 2 min obtendo-se, assim, o DNA total no fundo do tubo.

O DNA total extraído foi quantificado no fluorómetro *Qubit 4.0* (Invitrogen) e, para isso, utilizou-se o *Qubit 1x ds DNA HS Assay kit* (Invitrogen).

3.2.2.2. Amplificação dos genes de interesse por PCR

De forma a ser feita a validação dos genes preditos, foram desenhados manualmente *primers* com cerca de 20 pb (pares de base) a partir das sequências de DNA e cDNA, utilizando a ferramenta bioinformática NCBI *Primer-Blast*

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>; Altschul *et al.*, 1990) e *Tm calculator* no *Thermo Fisher Scientific* ([Tm Calculator | Thermo Fisher Scientific - PT](#)) (Tabela 3.2). Para isso, teve de se considerar as propriedades dos *primers* desenhados (% de guanina e citosina e a temperatura de *melting* que deve estar entre os 50°C e os 60°C) e, foi ainda efetuada uma avaliação à hibridação do *primer*. A empresa STAB VIDA, em Portugal, sintetizou os *primers* desenhados e quando os mesmos chegaram ao laboratório vinham liofilizados, sendo necessário hidratá-los a uma concentração de 100 µM. Posteriormente, preparam-se soluções de trabalho dos *primers*, onde se colocou 10 µL de solução preparada anteriormente e 90 µL de água destilada e esterilizada, de modo a obtermos uma concentração final de 10 µM.

Tabela 3.2 - Lista de *primers* correspondentes aos genes de interesse para PCR e RT-PCR. As sequências dos *primers* estão na direção 5'-3'.

Gene	Técnica	Primers	Sequência (5'- 3')	Tamanho de amplicon (pb)
C4302.17317	PCR	Forward	ATGGCTTATTACATTTCGC	1873
		Reverse	TTATTGGTATATGCTGTTGG	
C4302.28581	PCR	Forward	GATGCGGCTCTCTTTTC	2697
		Reverse	TCAATCCTTCTTCTTTGCAA	
C4302.29925	PCR	Forward	GTGGGTCAGTTGTTCAA	900
		Reverse	GATGAATCGAAAAGTTGGC	
C4302.20899	PCR	Forward	ACCGGCACTTTCTTGTTCCA	2208
		Reverse	GCCAAAACAGCCAAACCGAT	
	qPCR	Forward	TGCCATTGCGGATTTGTTGG	200
		Reverse	TCGTGTCCAGTTTGTGTGCT	
C4302.28117	PCR	Forward	ATGTTCCAACGAATAAAC	1262
		Reverse	TCATTCTCCAATGAATTC	
	qPCR	Forward	GCATGCCGAGCTGAATGAAG	137
		Reverse	GCATCACATTCATCGGCACC	
C4302.23116	PCR	Forward	ATGATGCCATACTTTGGC	359
		Reverse	CTACTGCTTCTTGCTCA	
	qPCR	Forward	TGGTTTCGTCCTTCCATCGG	156
		Reverse	TCCTTCAATTGGGGCACTCC	
C4302.30833	qPCR	Forward	GTTTCAGGCCCGAAAGATGGA	164
		Reverse	TGAGCATTTGCTAAGCCGGA	
C4302.7450	qPCR	Forward	CAGAATTGGGCCAACACGTG	103
		Reverse	TCCACATAGGTTAGCCGGA	
Actina	qPCR	Forward	TGGCATCCACGAGACTTCAT	146
		Reverse	CCAATGCGGTGATCTCCTTC	

pb – Pares de Base

Para que se proceda à amplificação dos genes de interesse, recorreu-se à técnica de PCR. Preparou-se uma mistura PCR com 0,625 µL de cada *primer* com concentrações de 0,25 µM (*forward* e *reverse*), 12,5 µL de Master Mix que continha dNTPs, Buffer Taq, Taq DNA polimerase e MgCl₂, 1 µL de DNA e fez-se o volume com água destilada e esterilizada. A reação foi feita para um volume final de 25 µL. Preparou-se ainda um controlo negativo que continha tudo com exceção do DNA. O programa PCR utilizado para amplificação foi:

desnaturação inicial a 95°C durante 3 min; 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 s, emparelhamento a uma temperatura de *annealing* conforme cada *primer* durante 30 s; alongamento a 72°C durante 1 min; e extensão final a 72°C durante 10 min. A temperatura de *annealing* para cada *primer* foi calculada anteriormente com base na equação 1:

$$T_a = T_m - 2^\circ\text{C} \quad (1)$$

onde T_a é a temperatura de *annealing* (°C) e T_m corresponde à temperatura de *melting* (°C) de cada *primer*.

3.2.2.3. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR amplificados foram analisados a partir da técnica de eletroforese em gel de agarose que permite estimar o tamanho dos fragmentos de ácidos nucleicos, neste caso de DNA. Preparou-se um gel de agarose 1% (w/v) em tampão TBE Buffer 0,5X, que após ser aquecido para dissolução, foi adicionado cerca de 1 µL de agente intercalante *greensafe premium* (NZYTech). Posteriormente, verteu-se a mistura para um berço previamente preparado com um pente de poços, estes que são selecionados com base na quantidade de amostras que se pretende analisar, e deixou-se repousar durante aproximadamente 40 min. Após solidificação do gel, colocou-se o mesmo numa tina de eletroforese horizontal preliminarmente revestida com tampão TBE Buffer 0,5X e ligada a uma fonte de energia VWR, *Power Source* 300 V (VWR). Adicionou-se 3 µL de marcador molecular num dos poços, podendo este ser de 1 Kpb (kilo pares de base) ou 100 pb DNA Ladder (BIORON) consoante o tamanho das amostras submetidas para análise e, nos restantes poços colocou-se 6 µL das amostras. A corrida decorreu durante 40 min com uma corrente de 300 mA e um potencial de 85 V. Após terminada a eletroforese, e de forma a poderem ser visualizados os resultados obtidos, colocou-se o gel no transiluminador de luz UV *Genoview* (VWR) e fotografou-se o mesmo com uma máquina fotográfica Canon *power shot* g10.

3.2.2.4. Purificação dos produtos de PCR, sequenciação e análise de sequências

Para a purificação dos produtos PCR utilizou-se o *MinElute PCR purification* kit (QIAGEN) seguindo o procedimento indicado pelo mesmo. Primeiramente, centrifugou-se os produtos PCR na minicentrífuga (Scanspeed) e mediu-se o volume de cada amostra. Adicionou-se 10 µL de acetato de sódio (pH 5,2 ± 1,3; 3 M) para diminuir o pH do produto e, assim, facilitar a absorção na membrana da coluna. Seguidamente, e após ter sido feito o

cálculo do volume das misturas (volume de cada amostra com os 10 µL de acetato de sódio), adicionou-se um volume igual de isopropanol em cada amostra e homogeneizou-se o conteúdo. Inseriram-se colunas fornecidas pelo kit para tubos de recolha de 2 mL, transferiram-se as misturas para as mesmas e levaram-se a centrifugar a 13 000 rpm durante 1 min. Para cada amostra, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 500 µL de solução tampão Buffer QG; levou-se a centrifugar sob as mesmas condições e voltou-se a descartar o sobrenadante. Colocou-se na coluna do mesmo tubo 750 µL de solução tampão Buffer PE, centrifugou-se a 13 000 rpm durante 1 min e descartou-se o sobrenadante. Realizou-se ainda outra centrifugação, desta vez a seco para retirar o etanol e os resíduos que ainda pudessem estar presentes na coluna, durante 1 min a 13 000 rpm e tornou-se a descartar o sobrenadante. Posteriormente, colocou-se a coluna num tubo de 1,5 mL e adicionou-se diretamente na membrana 10 µL de Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8,5). Aguardou-se 1 min à temperatura ambiente e, de seguida, centrifugou-se a 13 000 rpm durante 1 min para eluir o produto PCR purificado. Por fim, adicionou-se ao volume de PCR purificado 3 µL de *primer forward* de cada gene correspondente.

Os produtos de PCR purificados foram enviados para sequenciação para a empresa STAB VIDA (Portugal), após os tubos terem sido etiquetados e selados com parafilme. Os resultados foram analisados e tratados no programa “*BioEdit Sequence Alignment Editor 7.7*” (Hall, 1999) e, posteriormente, foram efetuados alinhamentos das sequências obtidas com as respetivas sequências preditas, de modo a ser verificada a percentagem de similaridade.

3.2.3. Síntese de cDNA a partir de RNA dos ensaios nematodocidas e validação por qPCR

Os ensaios nematodocidas foram realizados previamente no laboratório de nematologia em condições sub-letais. Para isso, foram colocados *P. penetrans* em contacto com os compostos que pretendem ser estudados em incubação durante 30 min, tempo que estimula os nemátodes, mas que não é letal para os mesmos. Procedeu-se à lavagem dos nemátodes com água destilada e esterilizada e conservaram-se os mesmos a -80°C.

Primeiramente, procedeu-se à extração de RNA total dos nemátodes através do *RNAeasy Plant Mini* kit (QIAGEN) e para quantificação do mesmo utilizou-se o *Qubit RNA HS* Assay kit (Invitrogen). As concentrações foram medidas através de um fluorómetro *Qubit 4* (Invitrogen) e encontram-se dispostas na tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Quantificação do RNA total extraído de *Pratylenchus penetrans* tratados com ddH₂O, DMSO (dimetilsulfóxido), oxamil, 3-octanol e benzaldeído e com as respectivas repetições biológicas e técnicas.

Tratamento	Repetição Biológica	Repetição Técnica	Concentração (ng/μL)
ddH ₂ O	II	2	15,5
DMSO	I	2	128
Oxamil	I	1	90,4
	II	1	18
3-octanol	I	1	68
	II	1	84,8
Benzaldeído	I	1	75,2
	II	1	69,2

Para a síntese de cDNA utilizou-se o *Super Script III first-strand synthesis system* kit (Invitrogen), seguindo os passos indicados no procedimento. Começou-se por colocar num tubo de 1,5 mL cerca de 2-10 μL de RNA total, 1 μL de mistura de oligo (dt)₂₀, 1 μL de mistura dNTP 10 mM e finalmente, perfez-se o volume com água destilada e esterilizada até atingir os 10 μL. Levou-se a mistura a incubar ao termociclador (BIORAD) a 65°C durante 5 min e, após esse tempo, colocou-se a mesma, de imediato, numa placa de gelo durante, pelo menos, 1 min. Posteriormente, adicionou-se 2 μL de tampão Buffer RT 10x, 4 μL de cloreto de magnésio 25 mM, 2 μL de DTT 0,1 M, 1 μL de RNase out (40 U/μL) e 1 μL de SuperScript III RT (200 U/μL) e, após centrifugação, a mistura voltou a ser incubada a 50°C durante 50 min e, logo de seguida, a 85°C durante 5 min. Levou-se novamente a mistura a uma placa de gelo e, de seguida, adicionou-se 1 μL de RNase H. Por fim, a mistura foi incubada a 37°C durante 20 min. O cDNA sintetizado serviu para validar os *primers* anteriormente desenhados (Tabela 3.2).

3.2.4. Quantificação relativa dos enzimas do *Pratylenchus penetrans* por RT-qPCR

O *real-time quantitative* PCR (RT-qPCR) é uma técnica analítica muito sensível que permite a deteção e quantificação de cDNA amplificado, por ciclos, à medida que a reação avança, isto é, em tempo real (Bio-Rad, 2006). Este processo ocorre devido à presença de uma molécula fluorescente, que permite a síntese de cDNA utilizando como molde o RNA de um organismo submetido a um determinado estímulo. O sinal fluorescente apresenta uma relação de proporcionalidade direta com a quantidade de DNA presente, sendo que um aumento na medida de fluorescência revela um aumento de DNA amplificado em cada ciclo (Bio-Rad, 2006). O número de ciclos de amplificação em função da fluorescência é representado através de um gráfico com uma curva sigmoide, conforme ilustrado na figura 3.6. Inicialmente, não é detetado os aumentos na fluorescência, no entanto, o acumular de produto amplificado leva a que se produza um sinal fluorescente detetável (Bio-Rad, 2006). Este é marcado pelo número de ciclos, C_T (*Cycle threshold*, limite inferior detetável),

representado no eixo das abcissas e o seu valor corresponde à quantidade inicial de transcrito (Bio-Rad, 2006).

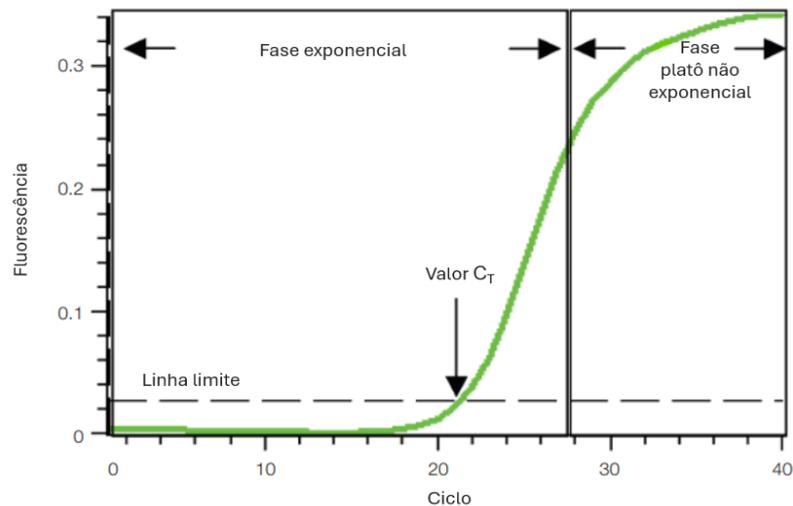


Figura 3.6 – Gráfico de amplificação. Imagem adaptada de Bio-Rad (2006).

Para este estudo, em particular, utilizaram-se três tratamentos, sendo estes o oxamil, o 3-octanol e o benzaldeído, e para servir de controlo recorreu-se ao uso de água destilada e esterilizada para o tratamento em que se utilizou oxamil, e DMSO (dimetilsulfóxido) para os tratamentos de 3-octanol e benzaldeído. A análise da expressão génica dos genes de interesse do *P. penetrans* por contacto com os respetivos tratamentos foi realizada por RT-qPCR e utilizou-se o *SensiFast SYBR Lo-Rox* kit (Meridian Bioscience). Para cada gene de interesse preparou-se em tubos de 1,5 mL uma mistura contendo 10 μ L de SensiFast SYBR, 0,8 μ L de *primer forward*, 0,8 μ L de *primer reverse* e 7,4 μ L de água destilada e esterilizada, volume necessário para perfazer os 20 μ L de cada poço da placa. Após levar ao vortex, dividiu-se o conteúdo pela placa e finalmente, adicionou-se 1 μ L de cDNA aos respetivos poços. No aparelho real-time (BIOER), através do programa PCR gene 9660, selecionou-se as condições necessárias para o decorrer do processo: desnaturação a 95°C durante 20 s e emparelhamento em ciclos de 95°C durante 15 s e 60°C durante 20 s. Por fim, os resultados obtidos foram tratados com auxílio do *Microsoft excel*, tendo sido determinada a quantificação relativa dos enzimas do *P. penetrans* através do coeficiente de expressão normalizado $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (2 - 4). Este método, também conhecido por método de Livack, é representado pelas seguintes expressões:

$$\Delta C_T(\text{teste}) = C_T(\text{alvo, teste}) - C_T(\text{referência, teste}) \quad (2)$$

$$\Delta C_T(\text{calibrador}) = C_T(\text{alvo, calibrador}) - C_T(\text{referência, calibrador}) \quad (3)$$

$$\Delta\Delta C_T(\text{teste}) = \Delta C_T(\text{teste}) - \Delta C_T(\text{calibrador}) \quad (4)$$

em que, os genes alvo correspondem aos genes de interesse, ou seja, aos enzimas do *P. penetrans* e o gene de referência à actina, que é um gene que está constantemente a ser regenerado na célula. Os diferentes tratamentos administrados (oxamil, 3-octanol e benzaldeído) são dados pela condição teste, e a condição calibrador é correspondente ao controlo (ddH₂O ou DMSO).

3.2.5. Tratamento dos resultados

Para o tratamento estatístico dos resultados utilizou-se o programa R através do software *jamovi* 2.3.28 (<https://www.jamovi.org>). Primeiramente, fez-se uma análise de estatística descritiva a nível da expressão dos genes, com média, desvio-padrão e erro-padrão, e representou-se graficamente os resultados obtidos. Posteriormente, realizou-se uma análise de variância ANOVA a um fator (Fisher) e verificou-se os pressupostos através do teste de Levene, teste à homogeneidade de variâncias. Por fim, efetuou-se o teste Post-Hoc de Tukey, que se aplica quando temos três ou mais grupos, como forma de avaliar os valores de significância entre as médias dos diferentes genes de interesse em relação ao gene de referência (actina). A análise foi realizada de forma independente para cada um dos tratamentos, 3-octanol, benzaldeído e oxamil, sendo que, para os dois primeiros utilizou-se como controlo o solvente DMSO e para o oxamil usou-se ddH₂O. Para os três tratamentos colocou-se como variável dependente o *fold-change* para cada gene.

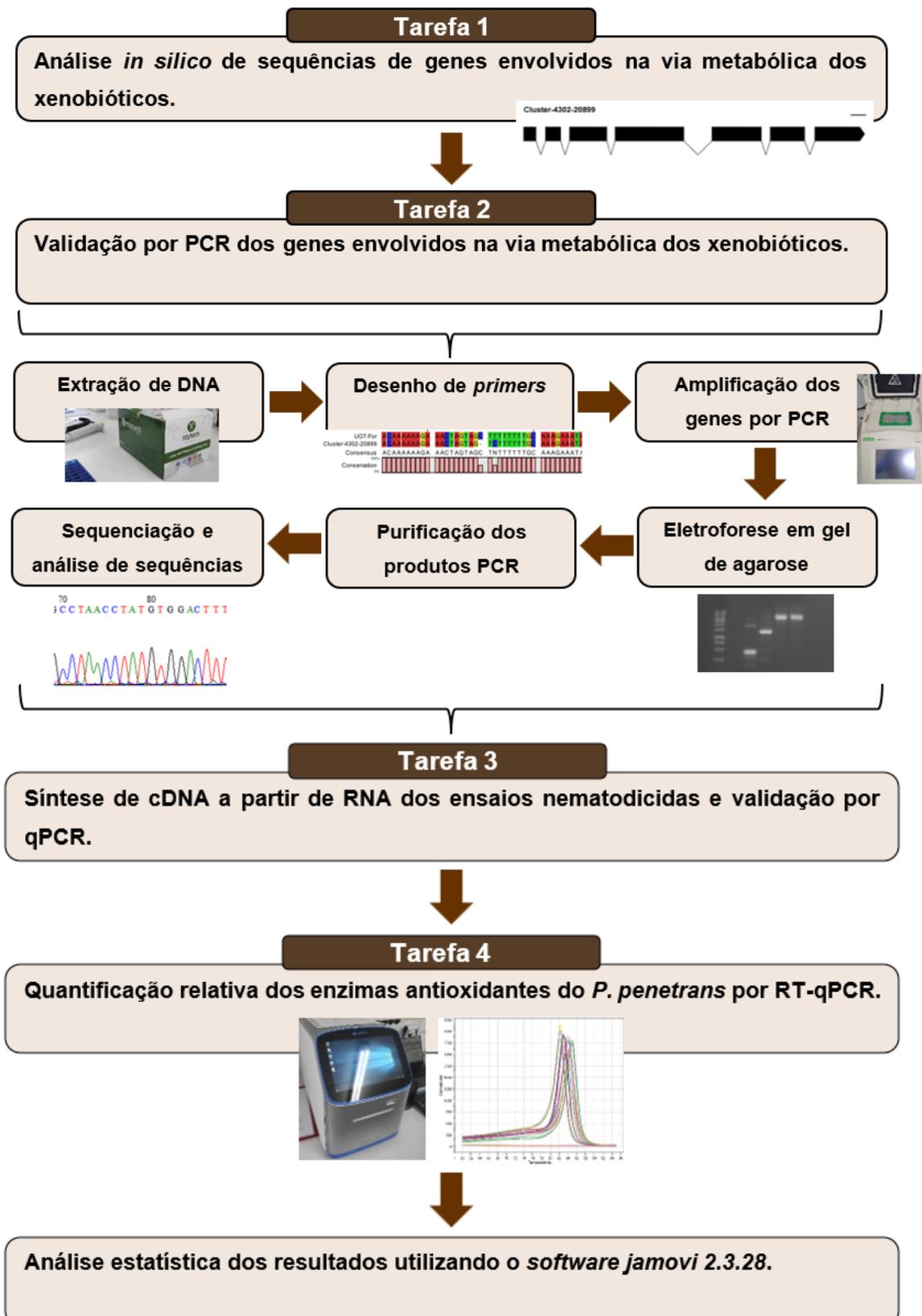
3.3. Equipamentos

- Balança de precisão (OHAUS Pioneer™)
- Homogeneizador (Marca VWR; Modelo *Mini Bead Mill*)
- Microcentrífuga (Marca Scanspeed; Modelo *Mini*)
- Centrífuga (Marca Scanspeed; Modelo *Mini*)
- Termobloco de banho seco (Marca Eppendorf; Modelo *Thermomixer compact*)
- Vortex (Marca VWR International; Modelo *444-1372*)
- Tina de eletroforese horizontal 50 mL (Marca Bio-Rad; Modelo *mini-sub cell GT*)
- Tina de eletroforese horizontal 100 mL (Marca Bio-Rad, Modelo *Wide mini-sub cell GT*)
- *Power Source* (Marca VWR, 300 V)
- Transiluminador de luz UV (Marca VWR; Modelo *Geno view*)
- Máquina fotográfica Canon *power shot g10*
- Termociclador (Marca BIORAD; Modelo *T100™*)
- Fluorómetro (Marca Invitrogen; Modelo *Qubit 4*)
- Centrífuga de placas RT-qPCR (Marca VWR; Modelo *PCR Plate Centrifuge II*)
- Termociclador RT-qPCR (Marca BIOER; Modelo *Quant. Gene 9600*)

3.4. Reagentes

- TBE (VWR, Buffer 0,5X)
- Agarose (NZYTech, MB14402)
- *Greensafe premium* (NZYTech, 1 mL Batch Y0051)
- Marcador 1 kpb DNA Ladder (BIORON, 0,25 mg/mL)
- Marcador 100 pb DNA Ladder (BIORON; 0,25 mg/mL)
- *Supreme NZYtaq II 2X Green Master Mix* (NZYTech)
- *Primers* (STAB VIDA, Portugal)
- Kit de extração de DNA: *NYZ Tissue gDNA Isolation kit* (NZYTech, Portugal).
- Kit de purificação: *MinElute PCR Purification kit* (QIAGEN)
- Kit de quantificação de DNA (Fluorómetro): *Qubit™ 1X dsDNA HS Assay kit* (Invitrogen)
- Kit de extração de RNA: *RNeasy Plant Mini kit* (QIAGEN)
- Kit de quantificação de RNA (Fluorómetro): *Qubit RNA HS Assay kit* (Invitrogen)
- Kit de síntese de cDNA: *Super Script III first-strand synthesis system kit* (Invitrogen)
- Kit de quantificação por qPCR: *SensiFast SYBR Lo-Rox kit* (Meridian Bioscience)

3.5. Diagrama do trabalho



4. Resultados e discussão

4.1. Análise *in silico* das sequências preditas dos enzimas do *Pratylenchus penetrans*

No seguimento do projeto PratyOmics, que visa o controlo do nemátode das lesões radiculares *P. penetrans* nas culturas agrícolas, foram eleitos para o estudo enzimas segregadas pelo fitoparasita que se encontram envolvidos no metabolismo dos xenobióticos. Os enzimas selecionados e os respetivos genes que os codificam foram: citocromos (CYP, C4302.28117 e C4302.30833), glucuronosiltransferases (UGTs, C4302.20899 e C4302.28581), glutathione S-transferases (GST, C4302.23116 e C4302.7450), epóxido hidrolase (EPHX, C4302.17317) e desidrogenase/reductase de cadeia curta (SDR, C4302.29925). As análises efetuadas *in silico* das sequências genómicas, codificantes e proteicas preditas encontram-se dispostas na tabela 4.4.

Os genes C4302.28117 e C4302.30833 codificam CYPs, enzimas que participam na primeira fase da biotransformação do metabolismo dos xenobióticos. Com base na análise *in silico*, o primeiro gene referenciado apresenta um tamanho de 1262 pb para a sequência genómica e 1065 pb para a sequência codificante, que corresponde a uma estrutura constituída por quatro exões e três intrões. Para a sequência de cDNA foi encontrada similaridade com a proteína CYP-33C9 do nemátode *Aphelenchus avenae* (KAH7716430.1), apresentando uma percentagem de identidade de 57,96% e um valor de *e-value* de $5e^{-130}$. A proteína predita deste gene possui 354 aa e, os dados de similaridade encontram-se em conformidade com a análise realizada com o cDNA, sendo a única diferença os valores de percentagem de similaridade e do *e-value* que são, respetivamente, 56,2% e $2e^{-140}$. A proteína não possui sinal peptídico e apresenta uma massa de 40,80 KDa e um ponto isoelétrico de 5,59. Relativamente ao gene C4302.30833, apenas é conhecido o tamanho da sequência codificante, sendo este de 440 pb. A sequência codificante é constituída apenas por exões devido a um processo designado de *splicing* catalisado pelo enzima transcriptase reversa (*Reverse Transcriptase*, RT), que elimina os intrões da sequência genómica do DNA quando este é sintetizado a partir de uma molécula de RNA mensageiro (*messenger ribonucleic acid*, mRNA). Por essa razão, a estrutura exão-intrão deste gene apresenta, somente, na sua constituição exões. Tanto a sequência de cDNA como a proteica apresentam similaridade com um produto não identificado de uma proteína do nemátode das galhas *Meloidogyne enterolobii* (CAD2195742.1). Para o cDNA o valor de similaridade apresentado é de 59,52% com um *e-value* de $6e^{-31}$, e para a proteína é de 61,11% com um *e-value* de $3e^{-17}$. O tamanho

da sequência proteica é de 122 aa, não apresenta sinal peptídico, o valor da massa predita da proteína é de 14,17 KDa e tem um ponto isoelétrico de 9,92.

Os genes C4302.20899 e C4302.28581 que codificam os UGTs, envolvidos nas reações de conjugação dos xenobióticos, foram analisados individualmente de forma predita através de ferramentas bioinformáticas. Para o gene C4302.20899 constatou-se que o tamanho predito da sequência genômica e da codificante é, respectivamente, 2208 pb e 1728 pb, possuindo, portanto, sete exões e seis intrões na sua estrutura. Foi encontrada similaridade, a partir da sequência codificante, de 54,31% e *e-value* de $1e^{-173}$ com um produto não especificado de uma proteína do *Meloidogyne enterolobii* (CAD2147061.1). Ao ser efetuada a análise predita da proteína verificou-se que a mesma continha uma sequência com 575 aa, apresentando similaridade de 53,46% e um *e-value* de 0 com um produto não especificado de uma proteína do *Meloidogyne enterolobii*. A sequência predita apresenta um sinal peptídico, o que poderá sugerir que a proteína é secretada. O sítio no qual é evidente a existência desse sinal, corresponde ao local de clivagem da sequência nucleotídica, por uma protease. A massa predita da mesma e o ponto isoelétrico apresentam, respectivamente, os valores de 65,36 KDa e 6,31. O gene C4302.28581 apresenta um genoma predito constituído por 2697 pb e um transcriptoma com 1707 pb, correspondendo à presença de treze exões e doze intrões. A sequência de cDNA apresentou correspondência com um produto não especificado de uma proteína do *Meloidogyne enterolobii* (CAD2134712.1), com similaridade de 73,43% e *e-value* de 0, à semelhança da análise efetuada com a sequência proteica que apenas apresentou diferente a similaridade, que foi de 72,21%. A proteína predita, constituída por 568 aa, assinalou a presença de sinal peptídico, apresentou uma massa de 65,21 KDa e um ponto isoelétrico de 9,44.

Os GSTs catalisam reações de conjugação com o glutatono na fase II do metabolismo dos xenobióticos e são codificantes dos genes C4302.23116 e C4302.7450. Em relação ao gene C4302.23116, e segundo a análise *in silico* efetuada, possui 359 pb na sequência genômica e 309 pb na sequência codificante, revelando ter uma estrutura composta por apenas um intrão e, conseqüentemente, dois exões. A sequência de cDNA apresentou correspondência de 59% com o glutatono S-transferase-1 do organismo *Meloidogyne graminícola* (KAF7638000.1), e um *e-value* de $3e^{-38}$, encontrando-se em concordância com a análise realizada à sequência proteica. A proteína predita apresentou um tamanho de 102 aa, uma massa de 11,55 KDa e um ponto isoelétrico de 9,13. A sequência não revelou ter sinal peptídico. Para o gene C4302.7450, desconhece-se a sequência de gDNA, estando apenas evidenciado o tamanho da sequência de cDNA com 157 pb, logo, a estrutura da mesma vai ser apenas constituída por exões. A partir da análise à sequência codificante verificou-se que a mesma tinha similaridade de 63,27% com um *e-value* de $2e^{-13}$ com uma proteína hipotética do *Meloidogyne graminícola* (KAF7635100.1). O tamanho da proteína predita foi de 50 aa.

Não foi encontrada similaridade através da sequência proteica, uma vez que se utilizou para a análise a predição da mesma e não aquela correspondente à nossa sequência de DNA. Posto isto, os dados referentes ao sinal peptídico (sem sinal), à massa da proteína (37,20 KDa) e ao ponto isoelétrico (6,48) foram obtidos com base nesta condição.

O gene C4302.17317, que codifica o enzima EPHX que participa nas reações de hidrólise da primeira fase do metabolismo dos xenobióticos, possui um tamanho de gDNA de 1873 pb e de cDNA de 1416 pb, sendo a sua estrutura composta por seis exões e cinco intrões. Tanto a análise feita a partir da sequência codificante, como da sequência proteica, apresenta correspondência de 59,29% com um produto não especificado de uma proteína do *Meloidogyne enterolobii* (CAD2175980.1), com um *e-value* de 0. A sequência proteica predita apresenta na sua constituição 471 aa, uma massa de 53,28 KDa e um ponto isoelétrico de 6,63. Possui sinal peptídico.

O enzima SDR, à semelhança dos CYP e dos EPHX, também participam na fase I da biotransformação do metabolismo dos xenobióticos. O gene C4302.29925 que codifica esse enzima, possui um tamanho do genoma de 900 pb e um transcriptoma de 477 pb, evidenciando a presença de três exões e dois intrões. As sequências de DNA codificante e proteica apresentaram correspondência com um produto não identificado de uma proteína do *Meloidogyne enterolobii* (CAD2166131.1) (71,64% de identidade; *e-value* de $2e^{-69}$). A proteína predita de 158 aa, com uma massa de 17,35 KDa e um valor de ponto isoelétrico de 4,80, não assinalou a existência de sinal peptídico. Para nenhum dos genes referidos conseguiu-se encontrar similaridade com outro organismo através da sequência genómica de DNA. Isto poderá derivar do facto do genoma do *P. penetrans* não estar publicado na base de dados e, ao ser procurada correspondência através do cDNA, que já não possui intrões, a sequência torna-se mais pequena e mais fácil de ser analisada pelas ferramentas bioinformáticas que, por conseguinte, conseguem estabelecer similaridade com outros organismos.

Tabela 4.4 – Análise *in silico* dos genes preditos que codificam os enzimas do *Pratylenchus penetrans*.

Enzima	Gene ID	gDNA (pb)	BLASTn (e-value; % identidade)	cDNA (pb)	BLASTx (e-value; % identidade)	Estrutura exão-intrão	Tamanho da proteína predita (aa)	BLASTp (e-value; % identidade)	Sinal peptídico	Massa predita da proteína (KDa)	Ponto isoelétrico
CYP	C4302.28117	1262	Not found	1065	Protein CYP-33C9 (<i>Aphelenchus avenae</i>) 5e ⁻¹³⁰ ; 57,96		354	Protein CYP-33C9 (<i>Aphelenchus avenae</i>), 2e ⁻¹⁴⁰ ; 56,2	No	40,80	5,59
	C4302.30833	*	*	440	Unnamed protein product (<i>Meloidogyne enterolobii</i>) 6e ⁻³¹ ; 59,52		122	Unnamed protein product (<i>Meloidogyne enterolobii</i>) 3e ⁻¹⁷ ; 61,11	No	14,17	9,92
UGT	C4302.20899	2208	Not found	1728	Unnamed protein product (<i>Meloidogyne enterolobii</i>) 1e ⁻¹⁷³ ; 54,31		575	Unnamed protein product (<i>Meloidogyne enterolobii</i>) 0; 53,46	Yes	65,36	6,31
	C4302.28581	2697	Not found	1707	Unnamed protein product (<i>Meloidogyne enterolobii</i>) 0; 73,43		568	Unnamed protein product (<i>Meloidogyne enterolobii</i>) 0; 72,21	Yes	65,21	9,44
GST	C4302.23116	359	Not found	309	Glutathione S-transferase-1 (<i>Meloidogyne graminicola</i>) 3e ⁻³⁸ ; 59		102	Glutathione S-transferase-1 (<i>Meloidogyne graminicola</i>) 3e ⁻³⁸ ; 59	No	11,55	9,13
	C4302.7450	*	*	157	Hypothetical protein Mgra 00005541 (<i>Meloidogyne graminicola</i>) 2e ⁻¹³ ; 63,27		50	Not found	No**	37,20**	6,48**
EPHX	C4302.17317	1873	Not found	1416	Unnamed protein product (<i>Meloidogyne enterolobii</i>) 0; 59,29		471	Unnamed protein product (<i>Meloidogyne enterolobii</i>) 0; 59,29	Yes	53,28	6,63
SDR	C4302.29925	900	Not found	477	Unnamed protein product (<i>Meloidogyne enterolobii</i>) 2e ⁻⁶⁹ ; 71,64		158	Unnamed protein product (<i>Meloidogyne enterolobii</i>) 2e ⁻⁶⁹ ; 71,64	No	17,35	4,80

pb (pares de base); aa (*Amino Acid*, aminoácido); KDa (Kilodalton)

* Não foi encontrada similaridade com a sequência de gDNA.

** Utilizou-se a predição da sequência proteica.

4.2. Validação dos genes que codificam enzimas do *Pratylenchus penetrans*

O *P. penetrans* é um nemátode capaz de afetar várias culturas agrícolas, no entanto, a resposta das plantas a essa invasão, leva à produção de diferentes enzimas pelo fitoparasita como forma de defesa. Para se proceder à validação dos genes preditos que codificam esses enzimas, recorreu-se às técnicas de eletroforese e PCR, de forma a ser efetuada a amplificação dos mesmos através do DNA extraído do nemátode. Os genes são validados quando se obtém uma banda com o tamanho aproximado do tamanho do gene predito pela análise *in silico*, conforme representado supra na tabela 3.2.

Na figura 4.7 são apresentadas as amplificações que foram realizadas com os diferentes genes. Com base nos resultados obtidos, é possível verificar que foram validados os genes C4302.28117, C4302.23116, C4302.30833, C4302.20899 e C4302.7450, ainda que tenha sido necessário repetir a amplificação para muitos deles, otimizando as condições de PCR do procedimento efetuado anteriormente (por exemplo, aumentou-se a concentração de DNA ou diminuiu-se a T_a). Em particular, para o gene C4302.20899, a primeira vez em que foi efetuada a sua amplificação, o seu tamanho não correspondia ao tamanho do gene predito, no entanto, e após ter sido realizada outra amplificação, o gene ficou validado. Não foi possível validar os restantes genes e, por isso, não foram utilizados para posterior análise. Para o gene C4302.17317 não se conseguiu obter uma banda muito visível e, por isso, optou-se por escolher outro gene para se proceder à sua amplificação e posterior validação. A amplificação do gene C4302.28581 não apresentou qualquer banda, apesar de terem sido efetuadas várias tentativas em que se otimizaram as condições de PCR sendo, portanto, considerado um gene não validado. Relativamente ao gene C4302.29925 observou-se mais do que uma banda visível de eletroforese, o que poderá ser indicativo da existência de uma família de genes, o que dificulta a sua análise posterior e, por essa razão não foi selecionado. Em nenhuma das amplificações registaram-se bandas no controlo negativo, mostrando não existir contaminações.

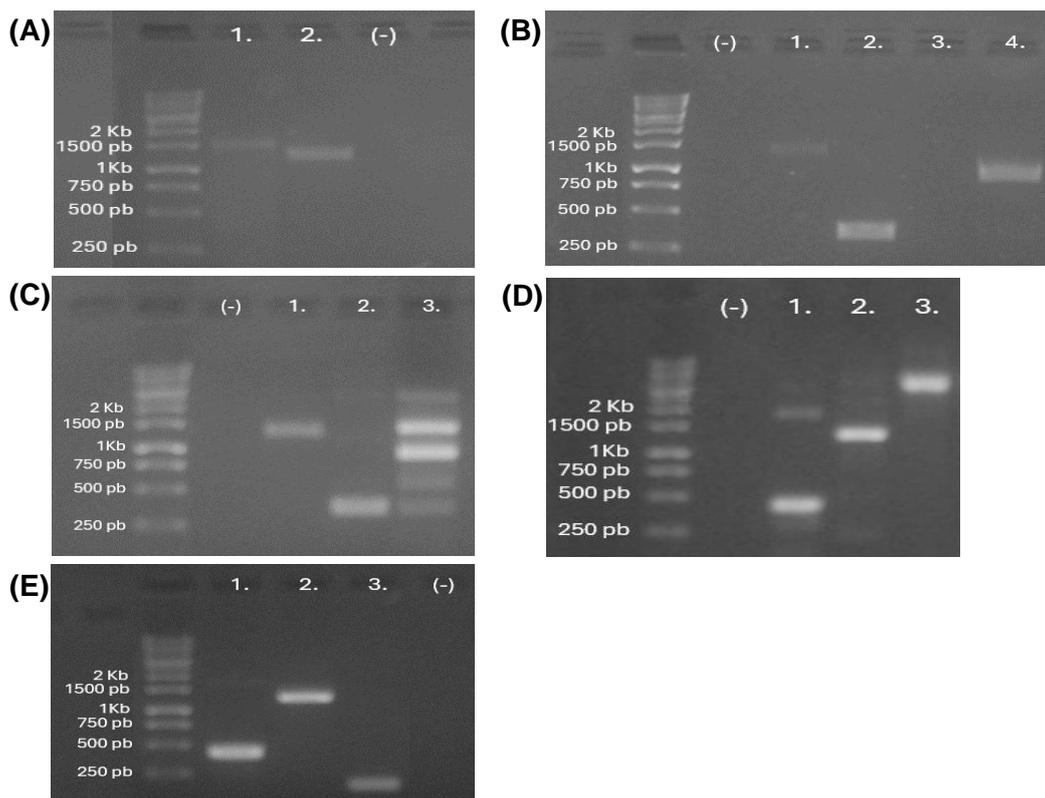


Figura 4.7 - Amplificação dos genes que codificam os enzimas a partir de DNA do *Pratylenchus penetrans*. Na figura (A) encontram-se representadas as bandas correspondentes: gene C4302.17317 (1), gene C4302.20899 (2), controlo negativo (-). Na figura (B) encontram-se representadas as bandas correspondentes: controlo negativo (-), gene C4302.28117 (1), gene C4302.23116 (2), gene C4302.28581 (3), gene C4302.29925 (4). Na figura (C) encontram-se representadas as bandas correspondentes: controlo negativo (-), gene C4302.28117 (1), gene C4302.23116 (2), gene C4302.29925 (3). Na figura (D) encontram-se representadas as bandas correspondentes: controlo negativo (-), gene C4302.30833 (1), gene C4302.28117 (2), gene C4302.20899 (3). Na figura (E) encontram-se representadas as bandas correspondentes: gene C4302.30833 (1), gene C4302.28117 (2), gene C4302.7450 (3) e, controlo negativo (-). Marcador utilizado: 1 Kpb DNA Ladder (BIORON).

Ainda foi efetuada uma validação dos genes transcritos do *P. penetrans*, utilizando o cDNA sintetizado com os respetivos tratamentos. Os produtos obtidos a partir da amplificação por RT-qPCR foram submetidos a uma análise de eletroforese e, os resultados encontram-se dispostos na figura 4.8 e na figura A.1 (ANEXO A). Foi possível validar a amplificação dos transcritos de todos os genes, obtendo-se fragmentos inferiores a 200 pb.

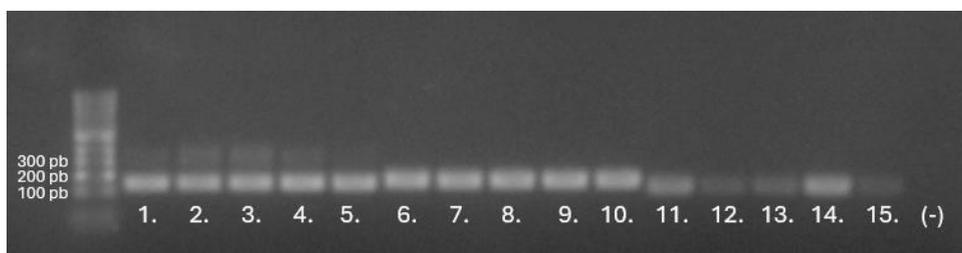


Figura 4.8 - Amplificação dos transcritos dos genes que codificam os enzimas do *Pratylenchus penetrans*. Legenda: cDNA + benz II 1 – C4302.28117 (1), cDNA + ox I 1 – C4302.28117 (2), cDNA + ox II 1 – C4302.28117 (3), cDNA + oct II 1 – C4302.28117 (4), cDNA + H₂O II 2 – C4302.28117 (5), cDNA + benz II 1 – C4302.23116 (6), cDNA + ox I 1 – C4302.23116 (7), cDNA + ox II 1 – C4302.23116 (8), cDNA + oct II 1 – C4302.23116 (9), cDNA + H₂O II 2 – C4302.23116 (10), cDNA + benz II 1 – C4302.7450 (11), cDNA + ox I 1 – C4302.7450 (12), cDNA + ox II 1 – C4302.7450 (13), cDNA + oct II 1 – C4302.7450 (14), cDNA + H₂O II 2 – C4302.7450 (15), controlo negativo (-). Marcador utilizado: 100 pb DNA Ladder (BIORON).

4.3. Efeito dos compostos 3-octanol, benzaldeído e oxamil na expressão relativa dos enzimas do *Pratylenchus penetrans*

A necessidade de encontrar nematodocidas mais eficientes e ecológicos para o controlo dos nemátodes fitoparasitas, tem vindo a ser um desafio crescente e que se encontra em constante evolução. Deste modo, têm sido estudados os mecanismos de ação de vários compostos que revelaram ter efeitos promissores no combate a estes fitoparasitas. No estudo Wram *et al.* (2022), o nemátode *Meloidogyne incógnita*, no segundo estágio de desenvolvimento, foi submetido a diferentes compostos nematodocidas (fluensulfona, fluazaindolizina, fluopiram e oxamil) durante 24 h, com o intuito de se avaliar as alterações que estes fitoquímicos provocam no transcriptoma do fitoparasita. O modo de ação, já conhecido, de dois dos fitoquímicos utilizados (fluopiram e oxamil) permitiu que fossem estabelecidos padrões de ação dos compostos (Wram *et al.*, 2022). Foram então estudadas diversas vias metabólicas (como por exemplo ciclo do ácido cítrico, *Citric acid cycle*, TCA; β -oxidação; ciclo do glioxilato; fosforilação oxidativa; e a via associada à acetilcolina) para que, desta forma, fosse possível identificar aquelas em que estes nematodocidas atuam e, conseqüentemente, entender o modo de resistência destes fitoparasitas aos compostos aplicados (Wram *et al.*, 2022). Relativamente ao ciclo do ácido cítrico, os genes dos enzimas que envolvem o seu conjunto de oito reações, não manifestaram apresentar alterações relevantes na sua expressão face aos tratamentos administrados, fluopiram e oxamil (Wram *et al.*, 2022). No entanto, o composto oxamil provocou a ativação do enzima isocitrato desidrogenase, catalisadora do substrato isocitrato a α -cetoglutarato (Wram *et al.*, 2022). Em contrapartida, os compostos fluensulfona e fluazaindolizina provocaram inibição na maioria dos enzimas envolvidos no TCA, sendo que, apenas o succinato desidrogenase e o 2-oxoglutarato desidrogenase foram ativados pelos respetivos tratamentos, fluensulfona e fluazaindolizina (Wram *et al.*, 2022). A β -oxidação é um processo catabólico de degradação de ácidos gordos em que, por cada reação, são removidos dois carbonos (Voet *et al.*, 2016). Os genes catalisadores dos enzimas envolvidos nesta via foram, de forma geral, regulados negativamente por parte dos tratamentos administrados (Wram *et al.*, 2022). Apenas os genes do enzima acil-CoA desidrogenase apresentaram uma expressão génica positiva para os compostos fluopiram, fluazaindolizina e oxamil (Wram *et al.*, 2022). Na via do glioxilato, uma via alternativa que os nemátodes possuem para o metabolismo de acetil-CoA e que está associado à do TCA, foram observados efeitos inibitórios nos enzimas envolvidos nesta via para todos os tratamentos, com exceção do oxamil que desencadeou a ativação do isocitrato liase (Wram *et al.*, 2022). Em relação ao processo de fosforilação oxidativa, que corresponde à etapa final da respiração celular e no qual ocorre a formação de várias moléculas de adenosina trifosfato (*Adenosine triphosphate*, ATP), apenas os enzimas succinato

desidrogenase, citocromo c redutase e citocromo c oxidase foram ativados através dos respectivos tratamentos, fluensulfona, fluazaindolizina e oxamil (Voet *et al.*, 2016); (Wram *et al.*, 2022). O neurotransmissor acetilcolina está envolvido em vários comportamentos dos nemátodes (Wram *et al.*, 2022). A acetilcolinesterase, recetor de acetilcolina, sofreu ativação por parte dos compostos fluopiram, fluensulfona, fluazaindolizina (Wram *et al.*, 2022). Já a ATPase tipo-V foi inibida em todos os tratamentos aplicados (Wram *et al.*, 2022). O estudo de Schleker *et al.* (2022), avaliou o modo de ação de um dos compostos referidos anteriormente (fluopiram), em vários nemátodes fitoparasitas. Este nematodocida é responsável por inibir o succinato desidrogenase (*succinate dehydrogenase*, SDH) que, conseqüentemente, pode gerar paralisia nos nemátodes, dependendo da concentração do composto utilizada (Schleker *et al.*, 2022).

No trabalho de Barbosa *et al.* (2024) foi avaliada a atividade nematodocida dos compostos orgânicos 3-octanol, benzaldeído e oxamil contra o nemátode *P.penetrans*. Entre eles destacaram-se os fitoquímicos 3-octanol e benzaldeído que revelaram ser fortes nematodocidas no combate ao fitoparasita em causa, destacando-se pela sua baixa toxicidade, e maior vantagem ecológica (Barbosa *et al.*, 2024). Neste seguimento, e como forma de desenvolver estratégias agrícolas mais eficazes no controlo do fitoparasita *P. penetrans*, foi estudada a expressão relativa dos genes de interesse com os diferentes tratamentos através da técnica de RT-qPCR. Pretende-se estabelecer comparações entre os tratamentos administrados nos genes selecionados e observar e comparar a quantificação relativa dos diferentes genes em relação ao gene de referência, a actina (gene constitutivo do nemátode). Na tabela 4.5 encontram-se os resultados do transcriptoma da análise diferencial da expressão dos genes de interesse para os tratamentos 3-octanol e benzaldeído, ambos com o solvente DMSO.

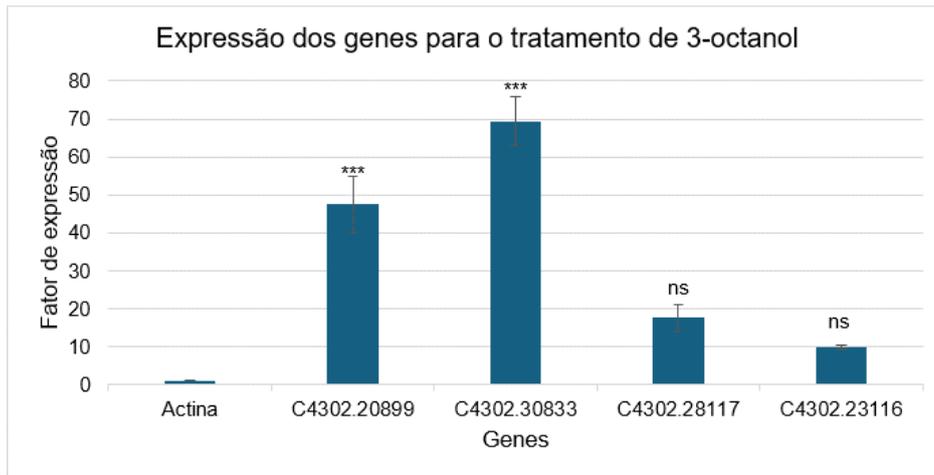
Tabela 4.5 – Resultados do transcriptoma da análise diferencial da expressão dos genes de interesse para os tratamentos 3-octanol e benzaldeído com o solvente DMSO. O símbolo * indica que os resultados não são estatisticamente diferentes com o DMSO.

	Fator de expressão (Log2)	
	3-octanol	Benzaldeído
C4302.20899	4.1043	3.2464
C4302.30833	5.2208	3.7414
C4302.28117	2.7396	1.8871
C4302.23116	1.9463	0.7436*

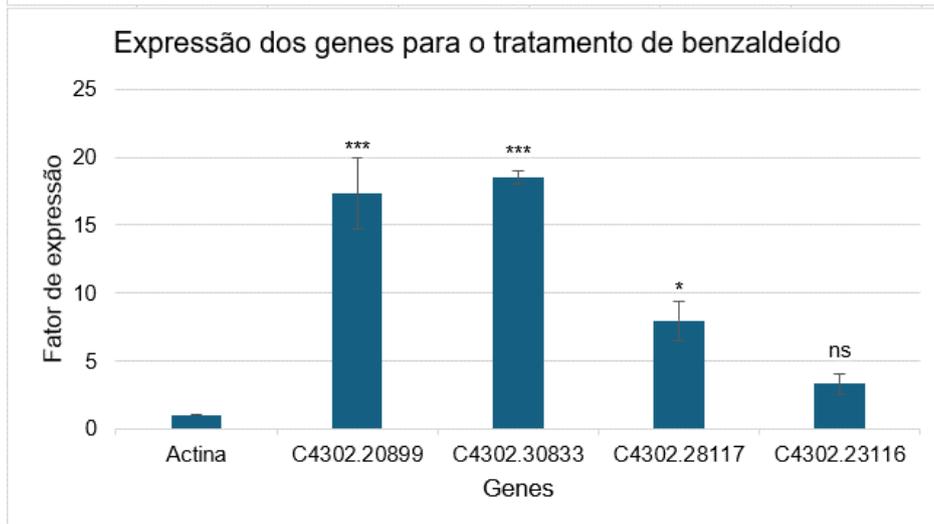
Para este estudo, realizaram-se três ensaios independentes, cada um com um determinado tratamento (3-octanol, benzaldeído e oxamil) e foram usados dois solventes (DMSO e ddH₂O) consoante o composto a ser utilizado. Para os tratamentos de 3-octanol e

benzaldeído foi utilizado como controlo o solvente DMSO, e para o oxamil, o solvente ddH₂O. O gene C4302.7450 não foi contabilizado para os tratamentos de 3-octanol e benzaldeído, uma vez que apresentou uma expressão relativa muito elevada comparativamente aos restantes genes, o que iria dificultar a análise e posterior comparação dos valores. Os resultados da expressão génica para cada ensaio estão apresentados nos gráficos 4.1 (A, B, C). Com base nos resultados obtidos, pode-se verificar que em todos os ensaios efetuados a expressão relativa dos genes que codificam os enzimas do *P. penetrans* (C4302.20899, C4302.30833, C4302.28117, C4302.23116 e, apenas para o composto oxamil, C4302.7450) aumentou relativamente ao gene actina, estipulado como referência. Para além disso, é ainda notório que entre os diferentes tratamentos, existem diferenças no aumento da expressão dos mesmos genes, sendo esse aumento mais evidente no ensaio realizado com o tratamento de 3-octanol e, menos visível quando dos genes se encontram expostos ao tratamento com oxamil. Foi ainda possível verificar que para os tratamentos, 3-octanol e benzaldeído, a expressão entre genes apresentam diferenças altamente significativas ($p < 0,001$) (ANEXO B, tabelas B.1, B.2 e B.3). Para o composto oxamil, a expressão dos genes apresenta diferenças significativas, $p = 0,020$ (ANEXO B, tabelas B.1, B.2 e B.3). O teste de Post-Hoc de Tukey permitiu estabelecer comparações entre as médias dos genes de interesse e o gene actina, na medida em que pressupõe que as variâncias dos diferentes grupos são iguais. Os resultados obtidos encontram-se distribuídos nas tabelas B.1, B.2 e B.3 do ANEXO B. Com base nas mesmas, pode-se aferir que para o tratamento 3-octanol existem diferenças significativas ($p\text{-value} < 0,001$) entre a expressão dos genes C4302.20899 e C4302.30833. Para o composto benzaldeído, foram verificadas diferenças significativas ($p\text{-value} < 0,001$) entre a expressão dos genes C4302.20899, C4302.30833 e C4302.28117 ($p\text{-value} < 0,05$). O tratamento com o fitoquímico oxamil também apresentou diferenças significativas ($p\text{-value} < 0,01$) entre genes C4302.20899, C4302.30833 e C4302.28117. Para nenhum destes três tratamentos foi evidente a existência de diferenças significativas com o gene C4302.23116. Em particular para o composto oxamil, não foram também reveladas diferenças significativas com a expressão do gene C4302.7450 ($p\text{-value} = 0,576$). Os resultados apresentados na tabela 4.5, à semelhança dos resultados obtidos neste estudo, revelam que os genes avaliados se encontram altamente expressos no transcriptoma do *P. penetrans*, validando, assim, a expressão relativa desses mesmos genes. À semelhança do trabalho Wram *et al.* (2022), e apesar dos nematodocidas utilizados serem diferentes e do fitoparasita ser outro, os enzimas envolvidos no metabolismo dos xenobióticos também revelaram apresentar uma expressão génica elevada evidenciando, assim, a tentativa de defesa do nemátode face aos fitoquímicos administrados.

(A)



(B)



(C)

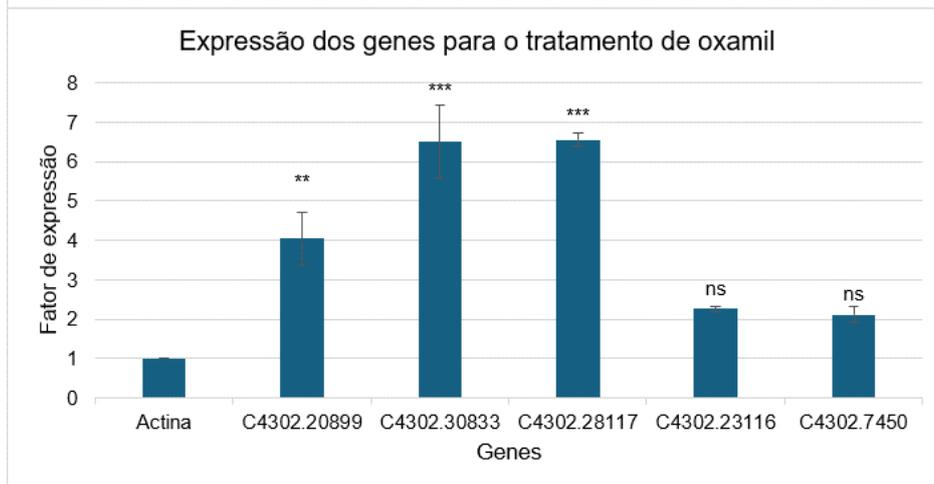


Gráfico 4.1 - Comparação da expressão relativa dos genes que codificam enzimas do *Pratylenchus penetrans* relativamente ao gene de referência actina no ensaio de 3-octanol (A), benzaldeído (B) e oxamil (C). Símbolos no topo das colunas indicam diferenças significativas, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

5. Conclusão

Os nemátodes fitoparasitas constituem uma grande ameaça para as culturas agrícolas, sendo o *P. penetrans* um dos mais destrutivos. Desta forma, é necessário desenvolver estratégias de proteção sendo, para isso, fundamental estudar-se o modo de ação de compostos nematodocidas que possam vir a revelar-se eficientes no controlo dos danos provocados por estes fitoparasitas. Neste trabalho, que consistiu no estudo do modo de ação dos fitoquímicos 3-octanol, benzaldeído e oxamil no *P. penetrans*, foram selecionados enzimas envolvidos no metabolismo dos xenobióticos (citocromos, glucuronosiltransferases, glutationo S-transferases, epóxido hidrolases e desidrogenases/reductases de cadeia curta), a fim de se avaliar a expressão dos genes que os codificam. Concluiu-se que todos os genes estudados se encontram altamente expressos no transcriptoma do *P. penetrans*, para os diferentes tratamentos administrados. O tratamento com 3-octanol evidenciou ter os valores mais elevados de expressão relativa em cada um dos genes, seguido do composto benzaldeído e, por fim, do oxamil.

Em trabalhos futuros é necessário estudar mais enzimas que sirvam de complemento às que foram avaliadas e estão envolvidas nas vias metabólicas dos xenobióticos.

6. Referências Bibliográficas

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Anjali, Kumar, S., Korra, T., Thakur, R., Arutselvan, R., Kashyap, A. S., Nehela, Y., Chaplygin, V., Minkina, T., & Keswani, C. (2023). Role of plant secondary metabolites in defence and transcriptional regulation in response to biotic stress. *Plant Stress*, 8. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100154>
- Barbosa, P., Faria, J. M. S., Cavaco, T., Figueiredo, A. C., Mota, M., & Vicente, C. S. L. (2024). Nematicidal Activity of Phytochemicals against the Root-Lesion Nematode *Pratylenchus penetrans*. *Plants*, 13(5). <https://doi.org/10.3390/plants13050726>
- Barbosa, P., Faria, J. M. S., Figueiredo, A. C., Mota, M., & Vicente, C. S. L. (2022). Control of the root lesion *Pratylenchus penetrans*-the effect of nematicidal activity of plant-derived compounds O controlo do nemátode das lesões radiculares *Pratylenchus penetrans*-actividade nematicida de compostos derivados de plantas. *Revista de Ciências Agrárias*, 2022(4), 649–652. <https://doi.org/10.19084/rca.28749>
- Barbosa, P., Faria, J. M. S., Mendes, M. D., Dias, L. S., Tinoco, M. T., Barroso, J. G., Pedro, L. G., Figueiredo, A. C., & Mota, M. (2012). Bioassays against pinewood nematode: Assessment of a suitable dilution agent and screening for bioactive essential oils. *Molecules*, 17(10), 12312–12329. <https://doi.org/10.3390/molecules171012312>
- Bio-Rad, L. (2006). *Real-Time PCR Applications Guide*.
- Buscaill, P., & Rivas, S. (2014). Transcriptional control of plant defence responses. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 20, pp. 35–46). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.04.004>
- Castillo, P., & Vovlas, N. (2007). *Pratylenchus, (Nematoda, Pratylenchidae): Diagnosis, Biology, Pathogenicity and Management (Nematology Monographs and Perspectives)* (D. Hunt & R. Perry, Eds.; Vol. 6). BRILL.
- Chin, S., Behm, C. A., & Mathesius, U. (2018). Functions of flavonoids in plant–Nematode interactions. *Plants*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/plants7040085>
- Chitwood, D. J. (2002). Phytochemical based strategies for nematode control. *Annual Review of Phytopathology*, 40, 221–249. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.032602.130045>
- Cui, H., Tsuda, K., & Parker, J. E. (2015). Effector-triggered immunity: From pathogen perception to robust defense. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 487–511. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040012>

- Desmedt, W., Mangelinckx, S., Kyndt, T., & Vanholme, B. (2020). A Phytochemical Perspective on Plant Defense Against Nematodes. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.602079>
- El-Saadony, M. T., Abuljadayel, D. A., Shafi, M. E., Albaqami, N. M., Desoky, E. S. M., El-Tahan, A. M., Mesiha, P. K., Elnahal, A. S. M., Almakas, A., Taha, A. E., Abd El-Mageed, T. A., Hassanin, A. A., Elrys, A. S., & Saad, A. M. (2021). Control of foliar phytoparasitic nematodes through sustainable natural materials: Current progress and challenges. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(12), 7314–7326. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.035>
- Esteves, I., Maleita, C., & Abrantes, I. (2015). Root-lesion and root-knot nematodes parasitizing potato. *European Journal of Plant Pathology*, 141(2), 397–406. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0551-1>
- 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*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/plants10122614>
- Fosu-Nyarko, J., & Jones, M. G. K. (2016). Advances in Understanding the Molecular Mechanisms of Root Lesion Nematode Host Interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 54(1), 253–278. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100257>
- Gasteiger, E. (2003). ExpASY: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3784–3788. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg563>
- Gillet, F. X., Bournaud, C., De Souza, J. D. A., & Grossi-De-Sa, M. F. (2017). Plant-parasitic nematodes: Towards understanding molecular players in stress responses. *Annals of Botany*, 119(5), 775–789. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw260>
- Hall, T. A. (1999). *BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT (7.7)*. Nucleic Acids Symposium Series, 41, 95-98.
- Hartman, J. H., Widmayer, S. J., Bergemann, C. M., King, D. E., Morton, K. S., Romersi, R. F., Jameson, L. E., Leung, M. C. K., Andersen, E. C., Taubert, S., & Meyer, J. N. (2021). Xenobiotic metabolism and transport in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*, 24(2), 51–94. <https://doi.org/10.1080/10937404.2021.1884921>
- Holbein, J., Grundler, F. M. W., & Siddique, S. (2016). Plant basal resistance to nematodes: an update. *Journal of Experimental Botany*, 67(7), 2049–2061. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw005>

- Howe, K. L., Bolt, B. J., Shafie, M., Kersey, P., & Berriman, M. (2017). WormBase ParaSite – a comprehensive resource for helminth genomics. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 215, 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.11.005>
- Ioannides, C. (2001). *Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics* (C. Ioannides, Ed.). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0470846305>
- Jibril, S. M., Jakada, B. H., Kutama, A. S., & Umar, H. Y. (2016). Plant and Pathogens: Pathogen Recognition, Invasion and Plant Defense Mechanism. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(6), 247257. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.506.028>
- Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G. J., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G. K., Kikuchi, T., Manzanilla-López, R., Palomares-Rius, J. E., Wesemael, W. M. L., & Perry, R. N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 14(9), 946–961. <https://doi.org/10.1111/mp.12057>
- Jones, M. G. K., & Fosu-Nyarko, J. (2014). Molecular biology of root lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) and their interaction with host plants. *Annals of Applied Biology*, 164(2), 163–181. <https://doi.org/10.1111/aab.12105>
- Khan, M., & Khan, A. U. (2021). Plant parasitic nematodes effectors and their crosstalk with defense response of host plants: A battle underground. *Rhizosphere*, 17. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100288>
- Kliebenstein, D. J. (2012). Plant defense compounds: Systems approaches to metabolic analysis. In *Annual Review of Phytopathology* (Vol. 50, pp. 155–173). <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-172950>
- Lee, H. A., Lee, H. Y., Seo, E., Lee, J., Kim, S. B., Oh, S., Choi, E., Choi, E., Lee, S. E., & Choi, D. (2017). Current understandings of plant nonhost resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(1), 5–15. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-16-0213-CR>
- Lindblom, T. H., & Dodd, A. K. (2006). Xenobiotic detoxification in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 305(9), 720–730. <https://doi.org/10.1002/jez.a.324>
- Magnusson, C. (2020). Nematodes as plant pathogens. In Tronsmo A., Collinge D., Djurle A., Munk L., Yuen J., & Tronsmo A. (Eds.), *Plant pathology and plant diseases* (pp. 132–163). CABI.
- Manohar, M., Tenjo-Castano, F., Chen, S., Zhang, Y. K., Kumari, A., Williamson, V. M., Wang, X., Klessig, D. F., & Schroeder, F. C. (2020). Plant metabolism of nematode pheromones mediates plant-nematode interactions. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14104-2>

- Matoušková, P., Vokřál, I., Lamka, J., & Skálová, L. (2016). The Role of Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Anthelmintic Deactivation and Resistance in Helminths. *Trends in Parasitology*, 32(6), 481–491. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.02.004>
- Mohanta, T. K., Arora, P. K., Mohanta, N., Parida, P., & Bae, H. (2015). Identification of new members of the MAPK gene family in plants shows diverse conserved domains and novel activation loop variants. *BMC Genomics*, 16(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1244-7>
- Orgiazzi, A., Bardgett, R. D., Barrios, E., Behan-Pelletier, V., Briones, M. J. I., Chotte, J.-L., De Deyn, G. B., Eggleton, P., Fierer, N., Fraser, T., Hedlund, K., Jeffery, S., Johnson, N. C., Jones, A., Kandeler, E., Kaneko, N., Lavelle, P., Lemanceau, P., Miko, L., ... Wall, D. H. (Eds.). (2016). *Global Soil Biodiversity Atlas*. European Commission, Publications Office of the European Union, Luxembourg. <https://doi.org/https://data.europa.eu/doi/10.2788/2613>
- Orlando, V., Grove, I. G., Edwards, S. G., Prior, T., Roberts, D., Neilson, R., & Back, M. (2020). Root-lesion nematodes of potato: Current status of diagnostics, pathogenicity and management. *Plant Pathology*, 69(3), 405–417. <https://doi.org/10.1111/ppa.13144>
- Palomares-Rius, J. E., Escobar, C., Cabrera, J., Vovlas, A., & Castillo, P. (2017). Anatomical alterations in plant tissues induced by plant-parasitic nematodes. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01987>
- Patil, S. A. (2020). *Plant Secondary Metabolites: Isolation, Characterization & Biological Properties*. Studera Press.
- Phani, V., Khan, M. R., & Dutta, T. K. (2021). Plant-parasitic nematodes as a potential threat to protected agriculture: Current status and management options. *Crop Protection*, 144. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105573>
- Pott, D. M., Osorio, S., & Vallarino, J. G. (2019). From central to specialized metabolism: An overview of some secondary compounds derived from the primary metabolism for their role in conferring nutritional and organoleptic characteristics to fruit. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00835>
- Poveda, J., Abril-Urias, P., & Escobar, C. (2020). Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes by Filamentous Fungi Inducers of Resistance: Trichoderma, Mycorrhizal and Endophytic Fungi. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00992>
- Ribeiro, L. G., Puerari, H. H., Silva, A. O., Vaz, K. A., dos Santos, J. V., Nunes, C. A., Barbosa, M. V., da Rocha, M. R., Siqueira, J. O., & Carneiro, M. A. C. (2023). Structure and composition of the nematode community in a restoration area affected by iron tailings. *Pedobiologia*, 97–98. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2023.150864>

- Sato, K., Kadota, Y., & Shirasu, K. (2019). Plant Immune Responses to Parasitic Nematodes. *Frontiers in Plant Science*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01165>
- Schleker, A. S. S., Rist, M., Matera, C., Damijonaitis, A., Collienne, U., Matsuoka, K., Habash, S. S., Twelker, K., Gutbrod, O., Saalwächter, C., Windau, M., Matthiesen, S., Stefanovska, T., Scharwey, M., Marx, M. T., Geibel, S., & Grundler, F. M. W. (2022). Mode of action of fluopyram in plant-parasitic nematodes. *Scientific Reports*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15782-7>
- Štefanac, T., Grgas, D., & Dragičević, T. L. (2021). Xenobiotics—division and methods of detection: A review. *Journal of Xenobiotics*, *11*(4), 130–141. <https://doi.org/10.3390/jox11040009>
- Teufel, F., Almagro Armenteros, J. J., Johansen, A. R., Gíslason, M. H., Pihl, S. I., Tsirigos, K. D., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2022). SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. *Nature Biotechnology*, *40*(7), 1023–1025. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01156-3>
- The Metabolomics Innovation Centre [TMIC]. (2010a, April 8). *FooDB*. Showing Compound 3-Octanol (FDB003343). <https://foodb.ca/compounds/FDB003343>
- The Metabolomics Innovation Centre [TMIC]. (2010b, April 8). *FooDB*. Showing Compound Benzaldehyde (FDB014661). <https://foodb.ca/compounds/FDB014661>
- Timbrell, J. A. (2009). *Principles of Biochemical Toxicology* (4th ed.). Informa Healthcare.
- Ugarte, C., & Zaborski, E. (2009). Soil Nematodes in Organic Farming Systems. *EOrganic*.
- Vicente, C., Inácio, M. L., Mota, M., & Vieira, P. (2021). O nemátode-das-lesões-radiculares, *Pratylenchus penetrans*. *Vida Rural*, *19* (8).
- Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2016). *Fundamentals of Biochemistry* (5th ed.). John Wiley & Sons.
- Williams, P. L., James, R. C., & Roberts, S. M. (2000). *Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications* (P. L. Williams, R. C. James, & S. M. Roberts, Eds.; 2nd ed.). John Wiley & Sons, INC.
- Wram, C. L., Hesse, C. N., & Zasada, I. A. (2022). Transcriptional changes of biochemical pathways in *Meloidogyne incognita* in response to non-fumigant nematicides. *Scientific Reports*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14091-3>
- Xiong, H., Pears, C., & Woollard, A. (2017). An enhanced *C. elegans* based platform for toxicity assessment. *Scientific Reports*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10454-3>
- Zipfel, C. (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, *20*(1), 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.11.003>

ANEXOS

ANEXO A – Amplificação dos transcritos dos genes que codificam os enzimas do *Pratylenchus penetrans*.

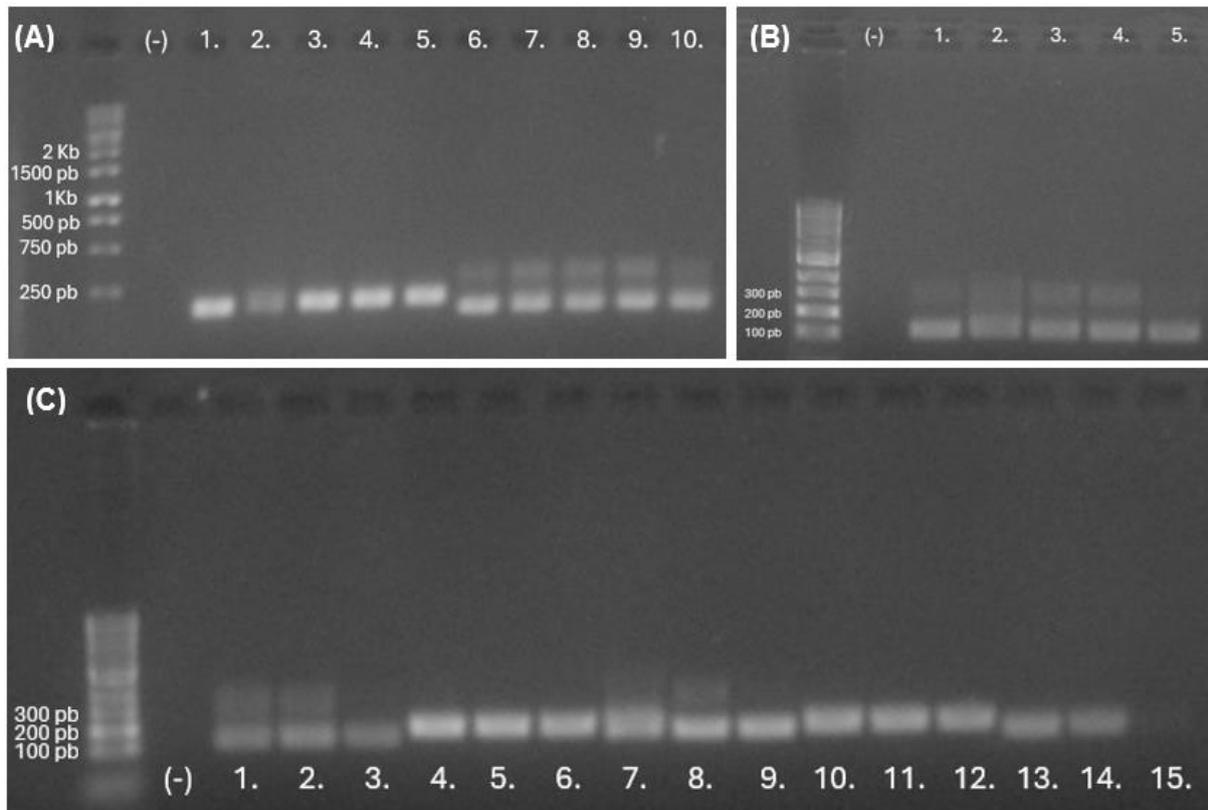


Figura A.1 - Amplificação dos transcritos dos genes que codificam os enzimas do *Pratylenchus penetrans*. Na figura (A) encontram-se representadas as bandas correspondentes: controlo negativo (-), cDNA + benz II 1 – C4302.30833 (1), cDNA + ox I 1 – C4302.30833 (2), cDNA + ox II 1 – C4302.30833 (3), cDNA + oct II 1 – C4302.30833 (4), cDNA + H₂O II 2 – C4302.30833 (5), cDNA + benz II 1 – C4302.20899 (6), cDNA + ox I 1 – C4302.20899 (7), cDNA + ox II 1 – C4302.20899 (8), cDNA + oct II 1 – C4302.20899 (9), cDNA + H₂O II 2 – C4302.20899 (10). Na figura (B) encontram-se representadas as bandas correspondentes: controlo negativo (-), cDNA + benz II 1 – C4302.20899 (1), cDNA + ox I 1 – C4302.20899 (2), cDNA + ox II 1 – C4302.20899 (3), cDNA + oct II 1 – C4302.20899 (4), cDNA + H₂O II 2 – C4302.20899 (5). Na figura (C) encontram-se representadas as bandas correspondentes: controlo negativo (-), cDNA + oct I 1 – C4302.20899 (1), cDNA + benz I 1 – C4302.20899 (2), cDNA + DMSO I 2 – C4302.20899 (3), cDNA + oct I 1 – C4302.30833 (4), cDNA + benz I 1 – C4302.30833 (5), cDNA + DMSO I 2 – C4302.30833 (6), cDNA + oct I 1 – C4302.28117 (7), cDNA + benz I 1 – C4302.28117 (8), cDNA + DMSO I 2 – C4302.28117 (9), cDNA + oct I 1 – C4302.23116 (10), cDNA + benz I 1 – C4302.23116 (11), cDNA + DMSO I 2 – C4302.23116 (12), cDNA + oct I 1 – C4302.7450 (13), cDNA + benz I 1 – C4302.7450 (14), cDNA + DMSO I 2 – C4302.7450 (15).

ANEXO B – Análise estatística.

Tabela B.1 - Análise estatística dos ensaios de 3-octanol, com DMSO como tratamento de controlo. Análise de estatística descritiva, análise de variância ANOVA com verificação de pressupostos e teste Post HOC de Tukey. Determinação dos valores de expressão significativos (jamovi 2.3.28).

Estatística Descritiva

Estatística Descritiva		
	Genes	Fold
Média	ACT	1.00
	C4302.20899	47.4
	C4302.30833	69.4
	C4302.28117	17.6
	C4302.23116	9.87
Erro-padrão da média	ACT	0.00
	C4302.20899	7.50
	C4302.30833	6.47
	C4302.28117	3.56
	C4302.23116	0.615
Desvio-padrão	ACT	0.00
	C4302.20899	10.6
	C4302.30833	9.15
	C4302.28117	5.03
	C4302.23116	0.869

ANOVA a um fator

ANOVA a um fator (Fisher)				
	F	gl1	gl2	p
Fold	61.5	4	7	< .001

Verificação de Pressupostos

Teste à Homogeneidade de Variâncias (Levene)				
	F	gl1	gl2	p
Fold	6.10e+30	4	7	< .001

[B]

Testes Post Hoc

Teste Post-Hoc de Tukey – Fold						
		ACT	C4302.20899	C4302.30833	C4302.28117	C4302.23116
ACT	Diferença média	—	-46.4***	-68.4***	-16.6	-8.87
	p-value	—	< .001	< .001	0.062	0.433
C4302.20899	Diferença média		—	-21.9*	29.8**	37.58**
	p-value		—	0.034	0.007	0.002
C4302.30833	Diferença média			—	51.7***	59.50***
	p-value			—	< .001	< .001
C4302.28117	Diferença média				—	7.76
	p-value				—	0.659
C4302.23116	Diferença média					—
	p-value					—

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

Tabela B.2 - Análise estatística dos ensaios de benzaldeído, com DMSO como tratamento de controlo. Análise de estatística descritiva, análise de variância ANOVA com verificação de pressupostos e teste Post HOC de Tukey. Determinação dos valores de expressão significativos (jamovi 2.3.28).

Estatística Descritiva

Estatística Descritiva		
	Genes	Fold
Média	ACT	1.00
	C4302.20899	17.3
	C4302.30833	18.5
	C4302.28117	7.95
	C4302.23116	3.32
Erro-padrão da média	ACT	0.00
	C4302.20899	2.63
	C4302.30833	0.449
	C4302.28117	1.47
	C4302.23116	0.736
Desvio-padrão	ACT	0.00
	C4302.20899	3.71
	C4302.30833	0.635
	C4302.28117	2.08
	C4302.23116	1.04

ANOVA a um fator

ANOVA a um fator (Fisher)				
	F	gl1	gl2	p
Fold	56.7	4	7	< .001

Verificação de Pressupostos

Teste à Homogeneidade de Variâncias (Levene)				
	F	gl1	gl2	p
Fold	2.48e+30	4	7	< .001

[3]

Testes Post Hoc

Teste Post-Hoc de Tukey – Fold						
		ACT	C4302.20899	C4302.30833	C4302.28117	C4302.23116
ACT	Diferença média	—	-16.3 ***	-17.51 ***	-6.95 *	-2.32
	p-value	—	< .001	< .001	0.012	0.539
C4302.20899	Diferença média		—	-1.16	9.40 **	14.03 ***
	p-value		—	0.951	0.005	< .001
C4302.30833	Diferença média			—	10.57 **	15.19 ***
	p-value			—	0.003	< .001
C4302.28117	Diferença média				—	4.63
	p-value				—	0.139
C4302.23116	Diferença média					—
	p-value					—

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

Tabela B.3 - Análise estatística dos ensaios de oxamil, com ddH₂O como tratamento de controlo. Análise de estatística descritiva, análise de variância ANOVA com verificação de pressupostos e teste Post HOC de Tukey. Determinação dos valores de expressão significativos (jamovi 2.3.28).

Estatística Descritiva

Estatística Descritiva		
	Genes	Fold
Média	ACT	1.00
	C4302.20899	4.05
	C4302.30833	6.50
	C4302.28117	6.56
	C4302.23116	2.26
	C4302.7450	2.12
Erro-padrão da média	ACT	0.00
	C4302.20899	0.676
	C4302.30833	0.921
	C4302.28117	0.178
	C4302.23116	0.0805
	C4302.7450	0.200
Desvio-padrão	ACT	0.00
	C4302.20899	1.35
	C4302.30833	1.84
	C4302.28117	0.357
	C4302.23116	0.161
	C4302.7450	0.400

ANOVA a um fator

ANOVA a um fator (Fisher)				
	F	gl1	gl2	p
Fold	24.2	5	18	< .001

Verificação de Pressupostos

Teste à Homogeneidade de Variâncias (Levene)				
	F	gl1	gl2	p
Fold	3.61	5	18	0.020

[3]

Testes Post Hoc

Teste Post-Hoc de Tukey – Fold							
		ACT	C4302.20899	C4302.30833	C4302.28117	C4302.23116	C4302.7450
ACT	Diferença média	—	-3.05 **	-5.50 ***	-5.5619 ***	-1.26	-1.124
	p-value	—	0.003	< .001	< .001	0.456	0.576
C4302.20899	Diferença média		—	-2.45 *	-2.5141 *	1.79	1.924
	p-value		—	0.021	0.017	0.141	0.097
C4302.30833	Diferença média			—	-0.0665	4.23 ***	4.372 ***
	p-value			—	1.000	< .001	< .001
C4302.28117	Diferença média				—	4.30 ***	4.438 ***
	p-value				—	< .001	< .001
C4302.23116	Diferença média					—	0.139
	p-value					—	1.000
C4302.7450	Diferença média						—
	p-value						—

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