



UNIVERSIDADE  
DE ÉVORA

Escola de Ciências e Tecnologia  
Departamento de Química e Bioquímica  
Licenciatura em Bioquímica

**Análise de expressão relativa em resposta ao silenciamento de  
um fator de transcrição no nemátode fitoparasita,  
*Bursaphelenchus xylophilus*.**

**Relatório de Estágio**

**Realizado por:** Gustavo Susano

**Orientadores:**

Doutora Margarida Espada

Doutora Isabel Velada

**Évora**

**2025**

“Este trabalho não inclui as observações do júri”



UNIVERSIDADE  
DE ÉVORA

Escola de Ciências e Tecnologia  
Departamento de Química e Bioquímica  
Licenciatura em Bioquímica

**Análise de expressão relativa em resposta ao silenciamento de  
um fator de transcrição no nemátode fitoparasita,  
*Bursaphelenchus xylophilus*.**

**Relatório de Estágio**

**Realizado por:** Gustavo Susano

**Orientadora:** Doutora Margarida Espada

**Coorientadora:** Doutora Isabel Velada

**Évora**

**2025**

“Este trabalho não inclui as observações do júri”

## Agradecimentos

Gostaria de começar por expressar a minha profunda gratidão às minhas orientadoras, Margarida Espada e Isabel Velada. A paciência, disponibilidade e ensinamentos foram essenciais ao longo de todo este percurso e ajudaram-me bastante nesta etapa desafiante, mas enriquecedora da minha vida. Senti-me verdadeiramente acolhido e motivado no laboratório de Nematologia e na Unidade de Microscopia, graças ao apoio constante e à forma como me integraram na equipa. Apesar de não ter estado no meu melhor a nível pessoal durante esta etapa, a experiência ajudou-me não só a enriquecer a minha formação académica e científica, mas também a superar-me pessoalmente.

À Universidade de Évora, agradeço pela oportunidade única que me proporcionou de crescer não só a nível académico, mas também pessoal. Deixo também um agradecimento especial à comissão de curso e a todos os professores que, com a sua dedicação e disponibilidade, tornaram possível este caminho.

Não poderia deixar de agradecer à minha família, que sempre esteve ao meu lado, apoiando-me em todos os momentos, especialmente nos mais difíceis. O vosso incentivo e confiança foram a minha força para continuar.

Por fim, um obrigado especial aos meus colegas e amigos de curso, que tornaram esta experiência mais leve, divertida e memorável. A partilha destes anos foi fundamental para o meu crescimento e ficará sempre na minha memória.

## Resumo

O nemátode da madeira do pinheiro (NMP) é um fitoparasita migratório originário da América do Norte onde não causa danos significativos, porém, é uma espécie invasora que infeta coníferas (em Portugal, pinheiro-bravo), causando a doença da murchidão do pinheiro. O NMP é um organismo de quarentena em muitos países, tendo sido detetado pela primeira vez na Europa em 1999, na Península de Setúbal e tem um impacto negativo nos ecossistemas florestais e na economia. Em estudos anteriores, com recurso a sequenciação de RNA (RNAseq), foram identificados os genes altamente expressos quando o nemátode infecta a planta comparativamente ao controlo. Um fator de transcrição da família dos *zinc finger* foi considerado importante durante a interação com o hospedeiro e a sua expressão foi silenciada. Neste trabalho pretende-se validar a expressão relativa de um conjunto de genes que, preditivamente, têm um decréscimo da expressão e compreender as vias metabólicas a que pertencem. Através da técnica de RT-qPCR (PCR em tempo real) foi possível validar a expressão de dois genes e verificar que têm uma diminuição da expressão quando o fator de transcrição foi silenciado.

## Palavras-Chave

*Bursaphelenchus xylophilus*, doença da murchidão do pinheiro, genes de parasitismo, fatores de transcrição, *Zinc Fingers*.

## **Abstract**

The pine wood nematode (PWN) is a migratory phytoparasite native to North America, where it does not cause significant damage. However, it is an invasive species that infects conifers (in Portugal, the maritime pine), causing pine wilt disease. PWN is a quarantine organism in many countries and was first detected in Europe in 1999, in the Setúbal Peninsula. It has a negative impact on forest ecosystems and the economy. In previous studies using RNA sequencing (RNA-seq), genes highly expressed during plant infection compared to the control were identified. A transcription factor from the zinc finger family was considered important during the interaction with the host, and its expression was silenced. This study aims to validate the relative expression of a set of genes that are predicted to show a decrease in expression and to understand the metabolic pathways to which they belong. the expression of two genes was validated by RT-qPCR (real-time PCR) and both showed downregulation of the expression when the transcription factor was silenced.

## **Keywords:**

*Bursaphelenchus xylophilus*, pine wood disease, parasitism genes, transcription factors, Zinc fingers

# Índice Geral

<i>Agradecimentos</i> .....	I
<i>Resumo</i> .....	II
<i>Palavras-Chave</i> .....	II
<i>Abstract</i> .....	III
<i>Keywords:</i> .....	III
<i>Índice de Tabelas</i> .....	VII
<i>Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos</i> .....	VIII
1. <i>Problemática</i> .....	1
2. <i>Objetivos do Trabalho</i> .....	2
3. <i>Descrição do Estado da Arte</i> .....	3
3.1. <i>Nemátodes fitoparasitas</i> .....	3
3.2. <i>O nemátode da madeira do pinheiro</i> .....	4
3.3. <i>Ciclo de vida do NMP</i> .....	5
3.4. <i>Interação nemátode-planta: estruturas celulares essenciais no parasitismo</i> ... 6	
3.5. <i>Proteínas de parasitismo</i> .....	7
3.6. <i>Regulação da expressão genética no parasitismo</i> .....	7
3.7. <i>Proteínas Zinc Finger</i> .....	8
3.8. <i>Classes mais abundantes de proteínas Zinc Finger nos nemátodes</i> .....	8
3.9. <i>Proteínas Zinc Finger do tipo C2H2</i> .....	9
3.10. <i>Proteínas Zinc Finger em parasitas (não-nemátodes) animais</i> .....	10
4. <i>Metodologia</i> .....	10
4.1 <i>Material biológico</i> .....	10
4.2. <i>Extração de DNA de B. xylophilus</i> .....	11
4.3. <i>Quantificação do DNA</i> .....	11
4.4. <i>Análise preditiva in silico dos genes candidatos</i> .....	12
4.5. <i>Amplificação dos genes por PCR</i> .....	13
4.6. <i>Eletroforese em gel de agarose</i> .....	15
4.7. <i>Quantificação e análise da expressão relativa de genes por RT-qPCR</i> .....	15
5. <i>Resultados experimentais e discussão</i> .....	17
5.1. <i>Caracterização e identificação dos genes candidatos para estudos</i> .....	17
5.2. <i>Quantificação do DNA genómico</i> .....	21
5.3. <i>Validação dos genes candidatos</i> .....	22
5.4. <i>Análise da expressão relativa dos genes candidatos</i> .....	24

6. Conclusões.....	26
7. Referências Bibliográficas.....	27

## Índice de Figuras

Figura 1- Nemátode da madeira do pinheiro ( <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> ). (Espada et al., 2022).....	1
Figura 2- <i>Monochamus galloprovincialis</i> , inseto-vetor do nemátode da madeira do pinheiro. (Pires et al., 2022).....	4
Figura 3- Esquema representativo da interação entre o NMP ( <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> ) e as células da planta hospedeira ( <i>Pinus</i> sp.). .....	7
Figura 4- Domínios e proteínas zinc finger. (a) Esquema do domínio ZF do tipo C2H2. (b) Estruturas dos domínios ZF mais comuns. C, cisteína; H, histidina; Zn <sup>2+</sup> , íon de zinco. (Ngwa et al., 2021) .....	9
Figura 5- Visualização por eletroforese em gel de agarose dos resultados da amplificação dos 5 genes candidatos por PCR. Marcador: 1 kb DNA Ladder ready-to-use (BIORON). .....	23
Figura 6 - Visualização por eletroforese em gel de agarose dos resultados da amplificação de 4 genes candidatos por PCR. Marcador: 1 kb DNA Ladder ready-to-use (BIORON). .....	24
Figura 7 - Comparação da expressão relativa de cada gene entre as condições em estudo.....	25

## Índice de Tabelas

Tabela 1- Lista de primers utilizados no estudo para amplificação das regiões codificantes dos genes .....	13
Tabela 2- Componentes e volumes utilizados na mistura de reação de PCR para a amplificação dos genes .....	14
Tabela 3- Programa de reação utilizado no PCR. ....	15
Tabela 4- Lista de primers utilizados no estudo para RT-qPCR.....	16
Tabela 5- Condições utilizadas na amplificação por RT-qPCR.....	17
Tabela 6- Análise in silico dos genes, transcritos e proteínas codificantes em estudo. Lista de primers para cada gene candidato e respectivas sequências, temperatura de melting e annealing.....	19
Tabela 7- Análise preditiva de similaridade de sequências por BLASTp.....	21
Tabela 8- Quantificação das amostras de DNA genómico por espectrofotometria. ....	22

## **Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos**

**bp**- [do inglês *Base Pairs*] – Pares de Base

**cDNA** - [do inglês *Complementary DNA*] – DNA Complementar

**gDNA**- [do inglês *Genomic DNA*] - DNA Genómico

**Ct**- [do inglês *Cycle Treshold*]

**DMP**- Doença da Murchidão do Pinheiro

**DNA**- [do inglês *Deoxyribonucleic acid*] - Ácido Desoxirribonucleico

**FT**- Fator de Transcrição

**FFN** - Fileira Florestal Nacional

**kb**- Kilobase

**NMP**- Nemátode da Madeira do Pinheiro

**PCR**- [do inglês *Polymerase Chain Reaction*] – Reação em Cadeia da Polimerase

**PWN** – [do inglês *Pine Wood Nematode*] - Nemátode da Madeira do Pinheiro

**OEPP**- Organização Europeia e Mediterrânica para a Proteção das Plantas

**RNA**- [do inglês *Ribonucleic acid*] - Ácido Ribonucleico

**RT-qPCR** – [do inglês *reverse transcription quantitative PCR*] – Transcrição Reversa seguida de PCR Quantitativa

**RNAseq**- [do inglês *RNA sequencing*] – Sequenciação de RNA

**µL** – microlitros

## 1. Problemática

O nemátode da madeira do pinheiro (*Bursaphelenchus xylophilus*, NMP) é um endoparasita migratório que afeta principalmente árvores do tipo coníferas em florestas da Ásia e em Portugal, afeta o pinheiro-bravo (*Pinus pinaster*). É um organismo de quarentena e o agente responsável pela doença da marchidão do pinheiro, uma condição que resulta no bloqueio dos vasos condutores da árvore, levando à sua morte num curto espaço de tempo (Vicente *et al.*, 2012). A doença da marchidão do pinheiro, é considerada uma ameaça para as florestas de pinheiros em todo o mundo (Ásia e Europa) e a sua rápida disseminação nos países onde foi detetada (Portugal, Espanha, Japão, China, Coreia) tem causado um grande impacto ao nível da sustentabilidade dos sistemas agroflorestais. A doença da marchidão do pinheiro surge como consequência do ataque do NMP ao sistema vascular das árvores de pinheiro. Quando o nemátode invade a árvore, obstrui os vasos condutores de água e nutrientes, provocando a deterioração da madeira e culminando na morte da árvore. Alguns dos sintomas desta doença são: o amarelecimento e marchidão das agulhas (primeiro as mais antigas, estendendo-se gradualmente a toda a copa) e a diminuição da produção de resina (Pires *et al.*, 2022).



Figura 1- Nemátode da madeira do pinheiro (*Bursaphelenchus xylophilus*). (Espada *et al.*, 2022)

As alterações climáticas têm um impacto considerável na propagação do NMP. O aumento das temperaturas médias e a intensificação das secas favorecem o crescimento populacional do nemátode e do seu vetor (Vicente *et al.*, 2022; Espada *et al.*, 2022 – Agrotec). Em climas mais quentes, os ciclos de vida do inseto vetor (género *Monochamus*) são acelerados, o que contribui para uma maior disseminação do parasita. Além disso, o stress hídrico gerado pelas secas torna as árvores mais vulneráveis.

O setor madeireiro enfrenta uma redução na produção de madeira de qualidade devido à degradação das florestas. Além disso, os custos relacionados com as medidas de controlo, como o abate e remoção de árvores infetadas, aumentam significativamente. A imposição de sanções comerciais a produtos florestais provenientes de regiões afetadas restringe a exportação, diminuindo a competitividade do setor. Atendendo aos seus potenciais impactos ao nível ecológico, económico e social, é considerado organismo prejudicial para a União Europeia e identificado, pela Organização Europeia e Mediterrânica para a Proteção das Plantas, como organismo de quarentena (Lista A2 da OEPP), existindo fortes restrições à circulação de plantas, material lenhoso, produtos e subprodutos das espécies hospedeiras do NMP (Sousa *et al.*, 2001). Em Portugal, a Fileira Florestal Nacional (FFN) é composta por várias empresas de exportação de madeiras e afins, o que reflete uma grande importância em termos económicos, contribuindo significativamente para o Produto Interno Bruto (PIB) (Espada *et al.*, 2022 - Agrotec). Esta doença tem um impacto negativo na economia portuguesa o que leva a encontrar-se novas soluções sustentáveis e, em simultâneo, compreender os mecanismos através dos quais os organismos parasitam as plantas.

Se compreendermos como o NMP interage molecularmente com o seu hospedeiro poderemos encontrar novas soluções para controlar a doença e a sua propagação.

## 2. Objetivos do Trabalho

Este trabalho tem como objetivo analisar os mecanismos moleculares que estão na base da interação entre o NMP, *Bursaphelenchus xylophilus*, e a sua planta hospedeira, bem como compreender o papel de elementos reguladores de expressão de genes relacionados com o parasitismo, como fatores de transcrição *zinc finger*.

Os objetivos específicos do trabalho são:

1. Após o silenciamento de um fator de transcrição pertencente à família *zinc finger*, compreender que genes têm a sua expressão potencialmente afetada preditivamente.

2. Validação da expressão relativa dos genes cuja expressão é afetada após o silenciamento do factor de transcrição.

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

### **3. Descrição do Estado da Arte**

#### **3.1. Nemátodes fitoparasitas**

Atualmente, já foram identificadas mais de 4100 espécies de nemátodes fitoparasitas, e estes representam um grande desafio para a produção agrícola e a segurança alimentar em todo o mundo. Estima-se que os danos causados por estes organismos ultrapassem os 80 mil milhões de dólares por ano. No entanto, este valor pode ser ainda maior, já que muitos agricultores, principalmente em países em desenvolvimento, não têm conhecimento da existência destes parasitas. Como são organismos pequenos e vivem no solo, os sintomas que provocam nas plantas nem sempre são fáceis de identificar (Jones *et al.*, 2013).

Os nemátodes fitoparasitas têm diferentes formas de interagir com as plantas. Todos possuem um estilete, uma espécie de lança oca, que utilizam para perfurar as células vegetais e alimentar-se. Alguns deles, chamados ectoparasitas migratórios, nunca chegam a entrar na planta, movendo-se pelo solo e alimentando-se das raízes sempre que as encontram. Já os endoparasitas migratórios penetram no interior da planta e deslocam-se pelos tecidos, causando estragos significativos. Existem também os semi-endoparasitas, que combinam características dos dois grupos anteriores, pois, em certas fases do seu ciclo de vida, penetram parcialmente na planta para se alimentarem. É importante destacar que o parasitismo de plantas por nemátodes evoluiu de forma independente em várias ocasiões, sendo que o biotrofismo também surgiu de forma independente em pelo menos quatro clados diferentes (Jones *et al.*, 2013).

### 3.2. O nemátode da madeira do pinheiro

O nemátode da madeira do pinheiro (*Bursaphelenchus xylophilus*), NMP, é um nemátode endoparasita migratório responsável pela doença da murchidão do pinheiro, que afeta vastas áreas florestais, com consequências graves para a indústria madeireira e ecossistemas florestais (Vicente *et al.*, 2012). Ao obstruir o sistema vascular das árvores, este parasita compromete a capacidade de transporte de água e nutrientes, levando à murchidão e à morte das árvores. Estes sintomas resultam da interação complexa entre três organismos: (1) o agente patogénico, NMP, *Bursaphelenchus xylophilus*, (2) o inseto vetor (do género *Monochamus*) ([Figura 2](#)) e (3) o hospedeiro, diferentes espécies de árvores coníferas.



*Figura 2- Monochamus galloprovincialis, inseto-vetor do nemátode da madeira do pinheiro. (Pires et al., 2022)*

A propagação desta doença pode resultar na morte de pinheiros, com consequências severas para as economias madeireira e setores florestais. Além disso, a doença da murchidão do pinheiro diminui a biodiversidade das áreas afetadas, uma vez que a destruição do pinhal afeta todo o ecossistema, desde a fauna até à flora. (Kim *et al.*, 2020). O NMP é originário da América do Norte e com o aumento do comércio global expandiu-se (através da madeira infetada) para outros países. A doença foi reportada no Japão no início do século XX e dispersou, posteriormente, para a China, Coreia e Tailândia (Vicente *et al.*, 2012). Na Europa, foi reportado pela primeira vez em Portugal no ano de 1999, onde tem contribuído para o declínio da floresta de pinheiro-bravo (Mota *et al.*, 1999; Vicente *et al.*, 2012). Desde então o NMP terá dispersado para o Centro e

Norte do País e Ilha da Madeira e mais recentemente foi reportado em Espanha ( Vicente *et al.*, 2012).

O pinheiro-bravo *Pinus pinaster* é a conífera mais abundante em Portugal, correspondendo a 29% de toda a floresta portuguesa (Pires *et al.*, 2022). Contudo, a sua área tem vindo a diminuir após séculos de expansão. Alguns dos fatores que podem explicar esta tendência preocupante são o desinteresse geral por áreas rurais, a falta de investimento na sua replantação ou a sua substituição por eucaliptal, vagas de incêndios cada vez mais frequentes, exacerbadas pelas alterações climáticas, e a DMP, provocada pelo NMP. Estima-se que a perda de stock florestal diretamente associada ao NMP poderá chegar aos 22 mil milhões de euros, num período de 22 anos (2008–2030) (Pires *et al.*, 2022).

O controlo desta praga exige elevados investimentos financeiros, incluindo o abate das árvores infetadas e a implementação de programas de reflorestamento.

### 3.3. Ciclo de vida do NMP

O nemátode da madeira do pinheiro (NMP) dissemina-se naturalmente de duas formas principais: por transmissão primária e secundária. Na transmissão primária, os insetos-vetores adultos alimentam-se dos ramos de pinheiros aparentemente saudáveis, libertando o NMP. Este é atraído pelos compostos voláteis emitidos pelo tecido vegetal danificado e aproveita as feridas causadas pela alimentação do inseto para entrar na planta. Uma vez no interior, o nemátode desloca-se pelos canais resiníferos, onde se alimenta das células do epitélio (fase fitófaga), comprometendo a produção de resina (Pires *et al.*, 2022). Numa fase mais avançada da DMP, o nemátode entra na fase mictófago, ou seja, em que se alimenta de fungos existentes na árvore em declínio (Vicente *et al.*, 2022).

A propagação do NMP é facilitada pela sua associação com o vetor *Monochamus galloprovincialis* (Figura 2), um inseto que transporta os nemátodes entre as árvores durante o seu ciclo de vida. Esta relação simbiótica permite ao NMP colonizar novas árvores de forma eficaz, especialmente em zonas de elevada densidade de pinheiros. A mobilidade do inseto e a elevada taxa de reprodução do nemátode tornam o controlo da doença um desafio significativo (Pires *et al.*, 2022). Embora Portugal seja o epicentro da doença na Europa, o NMP tem vindo a alastrar para outras regiões, como Espanha (Robertson *et al.*, 2011) e até mesmo regiões da Ásia como o Japão causando danos significativos, sobretudo devido ao transporte de madeira infetada e à dispersão natural do vetor. A expansão deste parasita representa uma ameaça crescente para as florestas europeias.

À medida que o stress hídrico aumenta devido à interrupção no transporte de água, a fotossíntese é comprometida e começam a surgir os primeiros sintomas visíveis: o amarelecimento das agulhas, seguido de uma murchidão progressiva. A árvore, fragilizada, torna-se mais susceptível a novos ataques de outros insetos, que encontram ali um local ideal para se reproduzir. Na transmissão secundária, por exemplo, as fêmeas de *Monochamus galloprovincialis* depositam os seus ovos em pinheiros que se encontram mortos ou em declínio, podendo também transmitir o NMP. Nestas árvores, o nemátode passa a alimentar-se predominantemente de fungos introduzidos por outros insetos, como os escolitídeos (fase micetófaga) (Pires *et al.*, 2022).

### **3.4. Interação nemátode-planta: estruturas celulares essenciais no parasitismo**

Durante a infecção, o NMP utiliza o seu estilete – uma estrutura com ação mecânica e oca - para penetrar nas células da planta e conseguir retirar os conteúdos citoplasmáticos assim como secretar proteínas de parasitismo ([Figura 3](#)) (Espada *et al.*, 2022; Eves-van den Akker, 2021). Na sua interação com o hospedeiro, o NMP produz várias proteínas, com diferentes funções, que lhe permitem degradar a parede celular, migrar e alimentar-se nos tecidos do hospedeiro (Espada *et al.*, 2016, 2018). Até ao presente, a maioria destas enzimas são produzidas em três células especializados no parasitismo – glândulas esofágicas ([Figura 3](#)). A interação entre o nemátode e as células da planta vai além da simples penetração física, envolvendo alterações bioquímicas nos tecidos vegetais. Ao invadir as células do xilema, o NMP interfere na dinâmica de transporte de água e nutrientes, afetando o funcionamento normal da planta e enfraquecendo as suas defesas contra o parasita (Espada *et al.*, 2022). A interação é mediada por proteínas relacionadas com o parasitismo e (maioritariamente) expressas nas glândulas esofágicas (SVG e DG), que estão localizadas na região anterior do nemátode. Estas proteínas são secretadas para o interior das células do hospedeiro através do estilete (S). Diferentes proteínas envolvidas no parasitismo estão envolvidas na migração, alimentação e defesas do nemátode fitoparasita ([Figura 3](#)) (Espada *et al.*, 2022).

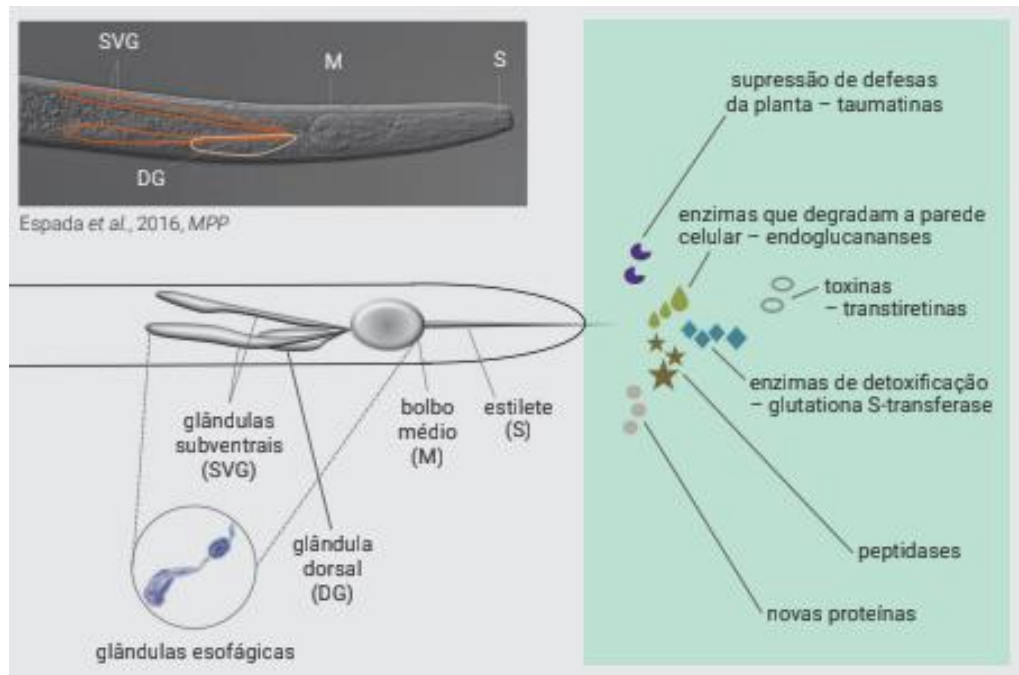


Figura 3- Esquema representativo da interação entre o NMP (*Bursaphelenchus xylophilus*) e as células da planta hospedeira (*Pinus sp.*).

### 3.5. Proteínas de parasitismo

A interação dos nemátodes fitoparasita e do NMP em particular, com os seus hospedeiros é mediada por proteínas de parasitismo: proteínas produzidas pelo parasita e secretadas dentro das células do hospedeiro vegetal que irão promover a doença. Entre essas proteínas, destacam-se as enzimas degradadoras da parede celular, como as endoglucanases que permitem ao nemátode penetrar nas células vegetais e alimentar-se dos componentes celulares. Além disso, o NMP secreta proteínas que têm como objetivo a supressão das defesas da planta (ex. taumatinas), peptidases para a degradação das proteínas da planta com a finalidade de se alimentar (Figura 3). Todas estas proteínas permitem que o NMP seja bem sucedido durante a infecção do hospedeiro (Espada *et al.*, 2016).

### 3.6. Regulação da expressão genética no parasitismo

O sucesso do parasitismo pode depender da regulação precisa da expressão dos genes do nemátode. Os fatores de transcrição, podem atuar como reguladores da expressão gênica, e potencialmente desempenhar um papel fundamental neste processo. No caso de *B. xylophilus*, os fatores de transcrição do tipo *zinc finger* são particularmente importantes. Estes fatores são proteínas que contêm um domínio *zinc finger*, o

que lhes permite interagir com o DNA e regular a transcrição de genes específicos. Uma das hipóteses que se coloca (no contexto do parasitismo), é que os fatores de transcrição possam ser responsáveis por alterar a transcrição de genes essenciais para o parasitismo tal como no caso do estudo Wang *et al*, 2023 onde os autores identificaram o efeito de um fator de transcrição específico, o PtNAC9, que desempenha um papel crucial na resistência das árvores de pinho contra a infeção por *B. xylophilus*. A ativação do PtNAC9 induz a expressão de genes relacionados à defesa, como os envolvidos na via do ácido salicílico, e aumenta a atividade de enzimas antioxidantes (Wang *et al*, 2023).

### **3.7. Proteínas Zinc Finger**

As proteínas *zinc finger* (*ZF*) são uma grande família de proteínas reguladoras com domínios em forma de “dedo” que ligam iões de zinco (Zn), permitindo a interação com RNA, DNA, poli-ADP-ribose, proteínas e lípidos (Ngwa *et al*, 2021).

Atualmente, estão descritos mais de 30 tipos diferentes de proteínas *ZF*, que estão implicados em vários processos celulares, incluindo a regulação transcricional, remodelação da cromatina, proteostase, transdução de sinal, bem como a proliferação e diferenciação celular (Ngwa *et al*, 2021). Por exemplo, nos humanos, as proteínas *ZF* têm sido associadas a uma ampla variedade de doenças, incluindo cancro, doença de Parkinson, psoríase, diabetes e doença cardíaca congénita, tornando-as potenciais alvos terapêuticos (Ngwa *et al*, 2021).

Geralmente, um domínio *ZF* é composto por uma sequência de ~30 aminoácidos com arranjos conservados de cisteínas e histidinas (Ngwa *et al*, 2021.). As proteínas *ZF* são categorizadas em nove subfamílias com base nos arranjos de cisteínas e histidinas dentro dos domínios *ZF*, a saber: C2H2, CCCH, C3HC4 (a subfamília de dedo *RING* [gene novo realmente interessante]), C2HC5, C4HC3 (a subfamília de dedo *PHD* [domínio *homeobox* de plantas]), C2HC, C4, C6 e C8 (Ngwa *et al*, 2021). Nos domínios C2H2, que foram os primeiros identificados na década de 1980, duas cisteínas seguidas por duas histidinas estão organizadas em torno do ião central de zinco (Figura 4). Para além do tipo C2H2, os tipos CCCH, *RING* e *PHD* são as subfamílias mais comuns nos eucariotas (Ngwa *et al*, 2021).

### **3.8. Classes mais abundantes de proteínas Zinc Finger nos nemátodes**

Uma das classes de proteínas *ZF* mais abundantes nos nemátodes é a classe C2H2. Esta classe apresenta uma distribuição por vários filos dentro dos eucariotas. Esta

família de genes contendo *zinc finger* C2H2 é uma das maiores e mais complexas famílias de genes nos genomas de metazoários. Sabe-se que estes genes existem em quase todos os eucariotas e constituem um importante subconjunto de fatores de transcrição eucarióticos. Os genes desta família geralmente ocorrem em agrupamentos nos genomas e acredita-se que tenham sofrido uma expansão maciça em vertebrados através de múltiplos eventos de duplicação em *tandem* (genes da família *zinc finger* C2H2 são copiados repetidamente, as cópias recém-geradas são inseridas logo ao lado das originais, formando agrupamentos (clusters) no genoma) (Seetharam & Stuart, 2013).

Um estudo anterior (Haerty *et al.*, 2008) onde foram analisadas famílias de transcrição (FT) em nemátodes (*C. elegans*, nematode de vida livre e um organismo modelo científico) revelou haver uma elevada proporção de membros das classes de *zinc finger* C2H2 e C4/NHR (Haerty *et al.*, 2008).

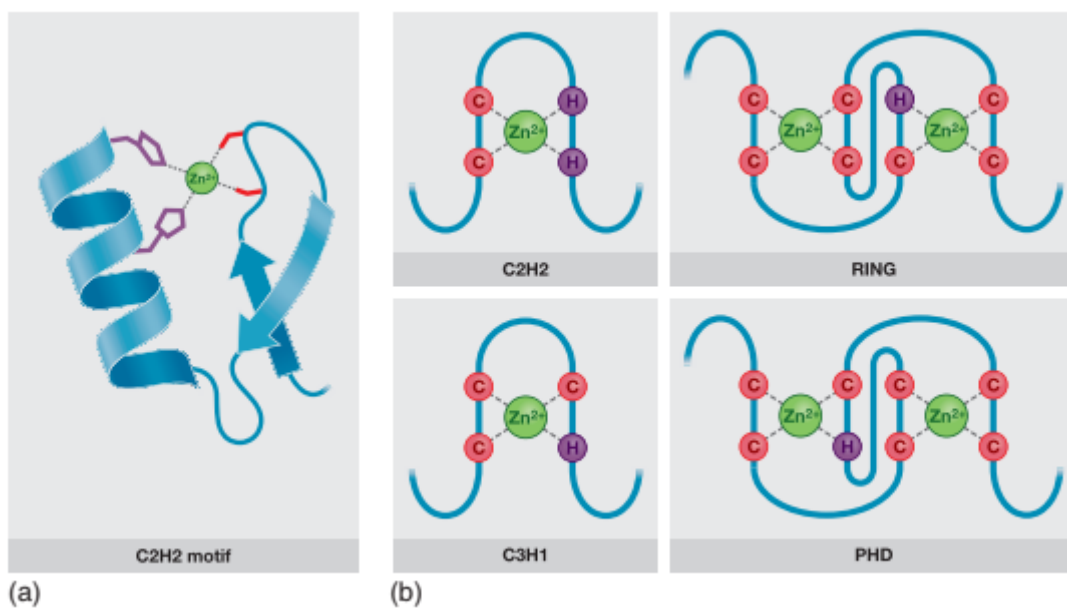


Figura 4- Domínios e proteínas zinc finger. (a) Esquema do domínio ZF do tipo C2H2. (b) Estruturas dos domínios ZF mais comuns. C, cisteína; H, histidina;  $Zn^{2+}$ , íon de zinco. (Ngwa *et al.*, 2021)

### 3.9. Proteínas Zinc Finger do tipo C2H2

As proteínas ZF-C2H2 incluem um grande número de fatores de transcrição que medeiam interações diretas com o DNA (Ngwa *et al.*, 2021). Adicionalmente, as proteínas ZF do tipo C2H2 também interagem frequentemente com RNA, e a ligação ao DNA e ao RNA envolve diferentes laços de dedo de zinco (Ngwa *et al.*, 2021).

Um único domínio C2H2 pode abranger uma sequência de DNA com três pares de bases consecutivos, e o contacto é geralmente estabelecido por aminoácidos distintos dentro da  $\alpha$ -hélice (Ngwa *et al*, 2021.).

Nas proteínas ZF, os domínios ZF do tipo C2H2, com diferentes características de ligação a triplos, são frequentemente combinados para proporcionar especificidade no reconhecimento de sequências de DNA mais longas (Ngwa *et al*, 2021).

### **3.10. Proteínas Zinc Finger em parasitas (não-nemátodes) animais**

Embora não haja estudos sobre esta família de proteínas em nemátodes parasitas, e em particular em fitoparasitas, existe alguma literatura sobre esta família de proteínas em parasitas humanos, uns mais próximos filogeneticamente dos nemátodes (ex: *Schistosoma mansoni* (platelminto), outros mais distantes (*Plasmodium falciparum*, protozoário do Filo *Apicomplexans*; *Trypanosoma cruzi*, protozoário do grupo *Excavates*) (Ngwa *et al*, 2021).

Por exemplo, o que foi concluído no estudo de Bitar e colaboradores (Bitar *et al.*, 2013) para o parasita pode ser colocado como hipótese para a fitoparasita (*Bursaphelenchus xylophilus*), ou seja, espera-se que os genes (potencialmente regulados por proteínas *zinc finger*), cuja expressão se vai validar, estejam também envolvidos em processos de desenvolvimento do fitoparasita.

Ao analisar as proteínas *zinc finger* em *B. xylophilus*, espera-se encontrar genes que possam ser igualmente regulados por estas proteínas, desempenhando papéis fundamentais nos processos biológicos do fitoparasita. A realização do silenciamento, a análise de transcrito e a validação por qPCR são abordagens eficazes para identificar e confirmar os potenciais alvos genéticos regulados por proteínas *zinc finger*, contribuindo para a compreensão do papel destas proteínas na regulação da expressão génica e, eventualmente, no controlo do ciclo de vida e adaptação do fitoparasita.

## **4. Metodologia**

### **4.1 Material biológico**

Neste estudo foi utilizado o nemátode da madeira do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*, isolado BxRef, proveniente de madeira de pinheiro-bravo em Portugal. O

isolado é mantido em cultura de cevada com recurso a *Botrytis cinerea* no Laboratório de Nematologia (Universidade de Évora).

## **4.2. Extração de DNA de *B. xylophilus***

A extração do DNA genómico (gDNA) do nemátode da madeira do pinheiro (NMP) foi realizada utilizando o kit comercial NZY Tissue gDNA Isolation Kit (NZYTech, Portugal), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante, com pequenas adaptações. Para cada amostra, uma quantidade de aproximadamente 2000 nemátodes foram colocados num microtubo de 1,5 mL. De seguida, adicionaram-se 180 µL de Buffer NT1, responsável pela lise celular, e 25 µL de uma solução de proteinase K, ambos fornecidos pelo kit. A mistura foi homogeneizada por vortex e incubada a 56°C durante 2 horas, com agitação constante a 400 rpm no termo bloco (Thermomixer Compact, Eppendorf) de modo a promover a digestão de proteínas e inativação de nucleases. Após a incubação, procedeu-se a nova homogeneização no vortex, à qual se seguiu a adição de 200 µL de Buffer NL, com homogeneização durante cerca de 10 segundos. Posteriormente, foram adicionados 210 µL de etanol a 100% (v/v) a cada amostra, seguidos de homogeneização imediata. Os lisados foram transferidos para colunas de purificação NZYS-pin Tissue Column (NZYTech, Portugal), previamente colocadas em tubos de recolha de 2 mL, e centrifugadas a 11000 x g durante 1 minuto. O eluato obtido foi descartado e as colunas transferidas para novos tubos de colheita. Seguiram-se duas etapas de lavagem: primeiro com 500 µL de Buffer NW1, seguido de centrifugação (1 min, 11000 x g); depois com 600 µL de Buffer NW2, igualmente com centrifugação nas mesmas condições. Após a lavagem, a membrana das colunas foi seca por centrifugação adicional de 2 minutos a 11000 x g. A eluição do DNA foi feita com a adição de 35 µL de Buffer NE diretamente sobre a membrana da coluna, seguida de uma incubação de 5 minutos à temperatura ambiente e centrifugação final de 2 minutos a 11000 x g. O DNA purificado foi recolhido num microtubo de 1,5 mL e armazenado a 4°C até posterior utilização. Como resultado do processo, obtiveram-se duas amostras de DNA genómico, designadas como DNA1 (BX1) e DNA2 (BX2).

## **4.3. Quantificação do DNA**

A quantificação do DNA do NMP foi realizada utilizando o equipamento *NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer* (ThermoScientific), baseado na leitura da absorvância

a 260 nm, 280 nm e 230 nm. Para cada amostra, foram realizadas duas medições de forma a garantir consistência nos resultados.

#### **4.4. Análise preditiva *in silico* dos genes candidatos**

Dos resultados previamente obtidos pelo laboratório de Nematologia, foi realizado o silenciamento de um gene que codifica um factor de transcrição. Os nemátodes cuja expressão do gene foi silenciada foram enviados para sequenciação de nova geração do RNA (na empresa Novogene, Reino Unido). Da análise dos dados dos genes cuja expressão foi afetada pelo silenciamento, selecionaram-se 5 genes candidatos utilizados neste estudo.

Foi realizada a análise preditiva de cinco genes de *Bursaphelenchus xylophilus* com o objetivo de obter informação sobre os genes, prever possíveis domínios das proteínas correspondentes e desenhar *primers* específicos para a amplificação do gene (região codificante) por PCR. Para isso, utilizaram-se as sequências dos genes, às quais aplicaram-se ferramentas bioinformáticas para desenhar os *primers* de forma adequada. Para obter a informação geral dos genes em análise, recorreu-se à base de dados *WormBase ParaSite* (<https://parasite.wormbase.org/index.html>), que reúne informação genómica de diversas espécies de nemátodes com genomas já publicados. Esta plataforma disponibiliza dados sobre a sequência do gene, domínios proteicos e comparações genómicas entre espécies relacionadas.

A ferramenta BLASTp foi utilizada para comparar com outras proteínas conhecidas e confirmar a homologia com proteínas do mesmo organismo. Por fim, recorreu-se à plataforma InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) para analisar as sequências traduzidas, o que permitiu identificar possíveis domínios conservados, famílias proteicas e funções associadas.

## 4.5. Amplificação dos genes por PCR

Para amplificação dos genes candidatos (BXYJ5.0601, BXYJ5.0201, BXYJ5.0300, BXYJ5.0301 e BXYJ5.0102) foi necessário desenhar *primers*, que foram desenhados (no programa *online* Primer 3 (v4.1. <https://primer3.ut.ee>), para as regiões codificantes da sequência, respeitando critérios básicos como o tamanho entre 18 a 25 nucleótidos, percentagem de GC entre 40–60%, temperaturas de *melting* semelhantes entre *primers* do mesmo par (para garantir eficiência na PCR), e tentando evitar a formação de estruturas secundárias, como *hairpins*, bem como dímeros de *primers* (Tabela 1). A orientação dos *primers* seguiu o sentido 5' → 3', sendo que o *primer forward* é complementar ao início da cadeia codificante, e o *reverse* complementar à cadeia oposta, no sentido inverso. Depois do desenho, verificou-se a especificidade dos *primers* através de uma análise *in silico*, para confirmar que amplificavam apenas os genes pretendidos.

Tabela 1- Lista de primers utilizados no estudo para amplificação das regiões codificantes dos genes

Genes candidatos	Sequência dos primers (5'-3')	Temperatura de <i>Melting</i> (°C)	Temperatura de <i>annealing</i> (°C)	Tamanho do primer (bp)	Tamanho da proteína (aa)
BXYJ5.0601	F→ATGAGGGTTCTTGTGGTAGG R→CAGAAGACCAATCT-GAAGAGA	54,01 51,54	49	1752 bp	524
BXYJ5.0201	F→ATGGATCCACACAAACA-GCTTC R→TAATAGCCTGGGGCAGTTCCG	55,64 56,95	49	1372 bp	380
BXYJ5.0302	F→TGCCTTATGGCTATCTCACT R→CGCAACCTTAACTCTTCTA-ATG	55,33 51,44	49	1391 bp	359
BXYJ5.0300	F→ATGTCTTCTGCTTTCCGTCG R→:AGCCGCTGGGCTCTTCAGAA	55,14 61,56	55	637 bp	181
BXYJ5.0102	F→ ATGAAGCTGTTTGTAGTGGC R→TTATCCGGAGAAGCTGTCCT	53,21 55,26	55	702 bp	233

Os *primers* foram sintetizados na empresa STAB Vida (Portugal). O liofilizado de cada tubo de *primers* foi solubilizado em água livre de nucleases para obter uma concentração de 100  $\mu\text{M}$  (solução stock).

Para a amplificação dos genes foi realizada técnica de PCR. A mistura de reação da PCR baseou-se na utilização da NZY Taq II 2 $\times$  Green Master Mix (NZYtech, Portugal). A composição detalhada do master *mix* utilizada para cada reação, num volume total de 25  $\mu\text{L}$ , é apresentada na [Tabela 2](#). Após a mistura inicial, os tubos foram ligeiramente agitados no *vortex* (velocidade baixa) e, em seguida, centrifugados por 10 s para assegurar que todo o líquido ficasse no fundo do tubo.

*Tabela 2- Componentes e volumes utilizados na mistura de reação de PCR para a amplificação dos genes*

<b>Componente</b>	<b>Volume (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
Água livre de nucleases	6,25
NZY Taq II 2 $\times$ Green Master Mix	12,50
Primer forward (stock 100 $\mu\text{M}$ )	0,625
Primer reverse (stock 100 $\mu\text{M}$ )	0,625
DNA genómico	5,00

O programa de termociclador (BIORAD) utilizado em todas as reações utilizou as condições listadas na [Tabela 3](#). Durante a etapa de hibridização (*annealing*), foi usada uma temperatura de 49°C (com base na temperatura de *melting* de cada *primer forward* e *reverse*) para os genes 0601, 0201, 0301 e 0201; entretanto, após análise preliminar em gel, os genes 0300 e 0102 foram otimizados para 55°C, mantendo todas as outras etapas inalteradas.

Tabela 3- Programa de reação utilizado no PCR.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95	3 min	1 ciclo
Desnaturação	95	30 s	35 ciclos
<i>Annealing</i>	49° C (± 55°C)	30 s	
Extensão	72	60 s	
Extensão final	72	5 min	1 ciclo

#### 4.6. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR amplificados foram analisados pela técnica de eletroforese em gel de agarose. Para isso, preparou-se um gel de agarose 1% (w/v) com 50 mL de TBE 0,5X e 0,6 g de agarose. A solução foi aquecida no micro-ondas (com o cuidado de não deixar ferver) até a agarose se dissolver na solução-tampão. Posteriormente, adicionou-se 0,5 µL do agente intercalante GreenSafe (NZYTech, Portugal) e procedeu-se à homogeneização da solução. A mistura foi vertida num berço, sendo colocado um pente para permitir formar os poços para aplicar as amostras. Deixou-se repousar durante aproximadamente 45 min até solidificar. Colocou-se o berço com o gel na tina horizontal de eletroforese ligada a uma fonte de energia. Pipetou-se 4 µL das amostras em cada poço (deixar um poço de intervalo entre as amostras com os produtos de PCR e os controlos, para evitar contaminação) e em último pipetou-se 2 µL de marcador molecular de tamanho 1 Kbp (BIORON) no primeiro poço. Fechou-se a tina e programou-se a corrida da eletroforese durante 40 min a uma voltagem de 80/90 V. Após a conclusão da eletroforese, fez-se a revelação da imagem, colocando-se o gel no transiluminador de luz UV para observação das bandas de eletroforese. No final fotografou-se o gel com sistema de documentação de géis (VWR).

#### 4.7. Quantificação e análise da expressão relativa de genes por RT-qPCR

Para a realização da RT-qPCR (*reverse transcription quantitative Polymerase Chain Reaction*), foram utilizados *primers* específicos distintos dos inicialmente usados na PCR convencional. A escolha de novos *primers* deveu-se à necessidade de garantir maior eficiência, especificidade e compatibilidade com as condições da reação de PCR em tempo real, evitando estruturas secundárias ou amplificações inespecíficas. Os novos

*primers* foram desenhados com base nas sequências dos genes de interesse, utilizando ferramentas de *design* específicas para qPCR, com foco na obtenção de produtos com tamanho ideal e temperaturas de *annealing* otimizadas. A [Tabela 4](#) apresenta as sequências dos *primers* utilizados para cada gene analisado por qPCR.

*Tabela 4- Lista de primers utilizados no estudo para RT-qPCR.*

<b>Genes candidatos</b>	<b>Sequências de primers (5'-3')</b>	<b>Tamanho do primer (bp)</b>
BXYJ5.0601	F→ GGCCATCATTCCATCCCCTA R→AGCAATGTCTCCTCCCGAAT	156
BXYJ5.0201	F→AAGATGAGCTGGCCTTCTGT R→ CGGTTTCCTCGGTCAATTC	244
BXYJ5.0302	F→ GCTCGAAATACTTGGCCGTT R→ GTTCTGACTGTTTGCTGGGG	170
BXYJ5.0300	F→TCTGCTTTCGTCGTATCGT R→CTGAGGAAGTTGAGGAGCGA	219
BXYJ5.0102	F→GCGATCTCCAAGACAACCAC R→CCCAAATACCAATCCCAGCG	199

A técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) foi utilizada com o objetivo de quantificar a expressão relativa de genes candidatos potencialmente envolvidos na resposta ao silenciamento. Esta técnica baseia-se na amplificação específica de DNA complementar (cDNA), permitindo o acompanhamento da reação em tempo real através da emissão de fluorescência proporcionada por moléculas intercalantes, como o SYBR Green, que se ligam ao DNA de dupla cadeia formado durante a amplificação. A intensidade da fluorescência é proporcional à quantidade de produto amplificado, permitindo inferir sobre a quantidade dos transcritos presentes na amostra.

Para a corrida de qPCR foram selecionados três genes: dois genes candidatos (gene 0300 e gene 0302), escolhidos com base na presença de bandas específicas na eletroforese em gel de agarose após PCR convencional, e um gene de referência, actina (ACT), que se presume apresentar expressão estável independentemente das condições. Os restantes genes inicialmente analisados foram excluídos desta análise devido à inespecificidade na amplificação do fragmento de DNA de interesse por PCR convencional. A reação e programa de RT-qPCR (GeneQuant 9600, BIOER) para cada gene de interesse e gene de referência foi preparada com os seguintes componentes para um volume final de 20 µL ([Tabela 5](#)):

Tabela 5- Condições utilizadas na amplificação por RT-qPCR.

Componente		Volume (µL)	
SensiFAST SYBR® No-ROX Mix 2X		10,0	
Primer Forward (0,8 µM)		1,0	
Primer Reverse (0,8 µM)		1,0	
cDNA		1,0	
H2O		7,4	

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Ativação inicial	95°C	2 minutos	1
Desnaturação	95°C	5 segundos	40
Annealing/extensão	60°C	20 segundos	

As reações foram preparadas numa placa de 96 poços para qPCR onde, para cada gene, foram usados dois poços com amostras controlo (sem silenciamento), dois poços com amostras submetidas ao silenciamento, um poço com a mistura de reação, mas sem cDNA (controlo negativo ou “branco”), para detetar possível contaminação. O programa utilizado no aparelho de PCR em tempo real (GeneQuant 9600, BIOER) seguiu o protocolo padrão 2-step *cycling* recomendado pelo fabricante do SensiFAST SYBR® No-ROX Mix (Bioline) ([Tabela 5](#)).

O cálculo da expressão relativa dos genes foi feito com o método (método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) descrito por Livak, 2001, para normalização dos dados (Livak *et al*, 2001).

## 5. Resultados experimentais e discussão

### 5.1. Caracterização e identificação dos genes candidatos para estudos

Foram analisados cinco genes candidatos de *Bursaphelenchus xylophilus*, designados como BXYJ5.0601, BXYJ5.0201, BXYJ5.0302, BXYJ5.0300 e BXYJ5.0102, com base em ferramentas bioinformáticas como InterPro, WormBase Parasite e BLASTp. Esta

análise permitiu prever os respectivos tamanhos gênicos e proteicos, bem como domínios funcionais e possíveis papéis biológicos no nemátode. Os resultados estão descritos na [Tabela 6](#).

O gene BXYJ5.0601 apresenta 1752 pares de bases, codificando uma proteína com 524 aminoácidos. A análise funcional revelou a presença de um domínio *FAD/NAD(P)-binding* (IPR000960), típico de oxidorreduções envolvidas em processos enzimáticos dependentes de cofatores redox. Este tipo de domínio sugere um possível papel metabólico da proteína na regulação de estados redox celulares, o que pode ser relevante em contextos de adaptação ao ambiente ou modulação da resposta do hospedeiro (Corrado *et al*, 2020).

BXYJ5.0201, com 1372 bp, codifica uma proteína de 380 aminoácidos com uma composição rica em domínios estruturais da cutícula. Foram identificados os domínios *Col\_cuticle\_N\_2* (IPR002486), *Nematode cuticle collagen N-terminal domain* (IPR0024869) e múltiplas cópias do motivo *Collagen triple helix repeat* (IPR008160). Estes domínios são característicos de colagénios específicos de nemátodes e sugerem uma função estrutural, possivelmente associada à integridade da cutícula ou a processos de desenvolvimento e diferenciação cuticular (Ekino *et al*, 2020).

O gene BXYJ5.0302, com 1391 bp e codificando uma proteína de 359 aminoácidos, revelou domínios funcionais pertencentes à família das peptidases ácidas. Entre estes destacam-se o domínio *Peptidase family A1* (IPR033121), *Acid proteases* (IPR021109) e *Eukaryotic aspartyl protease*. Estas proteases são comuns em organismos eucariotas e participam na clivagem de proteínas sob pH ácido, o que pode indicar um papel digestivo ou de modulação do ambiente no interior do hospedeiro vegetal, sendo, por isso, candidatos relevantes em contextos de parasitismo (Beers *et al*, 2023).

Por outro lado, BXYJ5.0300, com 637 bp e correspondente a uma proteína de 181 aminoácidos, não apresentou qualquer domínio funcional conhecido nas bases de dados consultadas. Esta ausência de anotação pode dever-se à baixa homologia com proteínas anteriormente caracterizadas, tratando-se potencialmente de uma proteína específica de *B. xylophilus* ou de função ainda não descrita na literatura. Apesar da ausência de informação funcional, o gene mantém-se relevante para estudo, uma vez que a falta de anotação pode representar uma oportunidade para identificar novas funções associadas ao parasitismo.

Por fim, BXYJ5.0102, com 702 bp, codifica uma proteína de 233 aminoácidos, identificada com domínios associados à atividade hidrolítica. Foram detetados os domínios *Barwin-like endoglucanases* (IPR036908) e *Glycosyl hydrolase family 45* (IPR000334),

ambos frequentemente associados à degradação da parede celular vegetal. Este tipo de atividade enzimática é coerente com funções atribuídas a efetores secretados por nemátodes fitoparasitas, implicados na penetração e colonização dos tecidos hospedeiros (Li *et al*, 2022).

Em suma, a análise preditiva dos genes selecionados revelou uma diversidade funcional significativa, com proteínas associadas a processos estruturais, atividades enzimáticas digestivas ou *redox*, bem como uma proteína sem anotação conhecida, potencialmente inovadora. Estas observações suportam a relevância dos genes para estudos posteriores de expressão e validação funcional no contexto da interação de *B. xylophilus* com o seu hospedeiro.

*Tabela 6- Análise in silico dos genes, transcritos e proteínas codificantes em estudo. Lista de primers para cada gene candidato e respectivas sequências, temperatura de melting e annealing.*

Genes candidatos	Sequência dos primers (5'-3')	Tamanho da proteína (aa)	Domínio da proteína ( <i>InterPro</i> )
BXYJ5.0601	F→ ATGAGGGTTCTTGTTAGG R→CAGAAGACCAATCTGAAGAGA	524	FAD/NAD(P)-binding domain ( <b>IPR000960</b> )
BXYJ5.0201	F→ATGGATCCACACAAACAGCTTC R→ TAATAGCCTGGGGCAGTTCG	380	Col_cuticle_N_2 ( <b>IPR002486</b> )  Nematode cuticle collagen N-terminal domain ( <b>IPR0024869</b> )  Collagen triple hélix repeat (20 cópias) ( <b>IPR008160</b> )
BXYJ5.0302	F→ TGCCTTATGGCTACTCTCACT R→ CGCAACCTTAACTTTCTAATG	359	Peptidase family A1 ( <b>IPR033121</b> ) Acid proteases ( <b>IPR021109</b> ) Eukaryotic aspartyl protease ( <b>IPR033121</b> )
BXYJ5.0300	F→ATGTCTTCTGCTTTCCGTCG R→:AGCCGCTGGGCTCTTCAGAA	181	Não conhecido
BXYJ5.0102	F→ ATGAAGCTGTTTGTAGTGGC R→ TTATCCGGAGAAGCTGTCCT	233	Barwin-like endoglucanases ( <b>IPR036908</b> )  Glycosyl hydrolase family 45 ( <b>IPR000334</b> )

Para analisar a similaridade das sequências proteicas deste estudo com outros organismos, realizou-se um BLASTP com todos as espécies nemátodes e com outros organismos. Na [Tabela 7](#) está representado o organismo com a sequência proteica mais similar à proteína respetiva do NMP. Pelos resultados obtidos do estudo preditivo da similaridade da sequência proteica feita no Wormbase parasite, a percentagem de identidade varia entre os 88,0% e os 26,5% (*e-value* entre 1.4E-27 e 8.4E-115). O gene BXYJ5.0601 revelou uma identidade extremamente elevada (88%) com uma sequência proteica de *B. okinawaensis*, com um *e-value* de 0.0, indicando uma homologia altamente significativa. Este nível de conservação sugere que a proteína correspondente é conservada no género *Bursaphelenchus*, sendo provável que esteja associada a processos celulares, como o metabolismo oxidativo, como já sugerido pelo domínio FAD/NAD(P)-binding anteriormente identificado.

De forma semelhante, o gene BXYJ5.0201 apresentou uma identidade de 85,1% com uma sequência homóloga de *B. okinawaensis* (*e-value* = 1,4E-27), o que aponta para uma possível função estrutural igualmente conservada. Tendo em conta que este gene codifica uma proteína rica em domínios colagénicos e associados à cutícula, a conservação observada reforça a sua possível importância na formação da cutícula e integridade corporal dos nemátodes.

Em contraste, o gene BXYJ5.0302 apresentou uma percentagem de identidade bastante reduzida (26,5%; *e-value* = 7,9E-13), o que pode indicar uma divergência funcional relevante. A baixa similaridade sugere que, apesar da presença de domínios típicos de peptidases ácidas, esta proteína poderá ter evoluído adaptações específicas ao estilo de vida fitoparasita de *B. xylophilus*, não sendo conservada no mesmo grau em *B. okinawaensis*, que é micófago. Este padrão é consistente com proteínas envolvidas na interação com o hospedeiro vegetal, cuja variabilidade é comum em efetores adaptativos.

O gene BXYJ5.0300 apresentou uma identidade intermédia (60,4%) com a sua sequência homóloga em *B. okinawaensis*, com um *e-value* de 5E-52. Apesar da ausência de domínios anotados nas bases de dados consultadas, a homologia moderada observada sugere que se trata de uma proteína conservada, embora com potencial divergência funcional ou estrutural que poderá justificar a ausência de anotação funcional. Este gene poderá representar uma proteína com funções ainda não caracterizadas no género *Bursaphelenchus*.

Por fim, BXYJ5.0102 demonstrou uma percentagem de identidade elevada (82,4%; *e-value* = 8,4E-115) com uma proteína de *B. okinawaensis*. Esta forte conservação é

coerente com a presença de domínios glicosil hidrolase da família GH45, uma celulase associada à degradação da parede celular vegetal. A homologia observada entre espécies com diferentes hábitos alimentares micófago e fitoparasita indica que estas enzimas poderão desempenhar papéis mais amplos, tanto na digestão de celulose em ambientes fúngicos como na penetração e colonização de tecidos vegetais. Em suma, a análise de similaridade interespecies permite distinguir entre proteínas altamente conservadas, geralmente associadas a funções celulares ou estruturais essenciais, e proteínas menos conservadas que poderão refletir adaptações funcionais específicas ao parasitismo.

Tabela 7- Análise preditiva de similaridade de sequências por BLASTp.

Identificação do Gene	Organismo	Descrição	% de identidade	E-value
BXYJ5.0601	<i>Bursaphelenchus okinawaensis</i>	Nemátode filogeneticamente próximo de <i>B. xylophilus</i> , utilizado como modelo em estudos genéticos e evolutivos.	88.0	0.0
BXYJ5.0201	<i>Bursaphelenchus okinawaensis</i>		85.1	1.4E-27
BXYJ5.0302	<i>Bursaphelenchus okinawaensis</i>		26.5	7.9E-13
BXYJ5.0300	<i>Bursaphelenchus okinawaensis</i>		60.4	5E-52
BXYJ5.0102	<i>Bursaphelenchus okinawaensis</i>		82.4	8.4E-115

## 5.2. Quantificação do DNA genómico

As amostras de gDNA de *B. xylophilus* foram quantificadas por espectrofotometria no *NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer* (ThermoScientific). As razões de absorvância 260/280 nm e 260/230 nm foram utilizadas como indicadores de qualidade do DNA. Uma razão 260/280 nm próxima de 1,8 é geralmente indicativa de DNA com elevada qualidade, enquanto a razão 260/230 nm deve situar-se idealmente entre 2,0–2,2. No caso da amostra DNA1, o valor de concentração obtido na primeira medição (7,3 ng/μL)

foi desconsiderado por se encontrar fora do intervalo esperado e não compatível com a segunda medição. Para a amostra DNA2, foi calculada a média entre as duas medições, resultando numa concentração final utilizada de 18,15 ng/μL. A [Tabela 8](#) apresenta os resultados das medições realizadas.

*Tabela 8- Quantificação das amostras de DNA genómico por espectrofotometria.*

Amostra	Medição	260/280	260/230	Concentração (ng/μL)
DNA1	1ª	2,82	2,11	7,3* (ignorada)
DNA1	2ª	1,78	0,38	26,2
DNA2	1ª	2,07	0,56	21,2
DNA2	2ª	2,36	1,01	15,1
<b>DNA2</b>	—	—	—	<b>18,15 (média)</b>

### 5.3. Validação dos genes candidatos

Após a amplificação inicial por PCR com temperatura de *annealing* de 49°C, os cinco genes em estudo (BXYJ5.0601, 0201, 0302, 0300 e 0102) foram analisados por eletroforese em gel de agarose, permitindo uma avaliação qualitativa da eficiência da amplificação ([Figura 5](#)). O gene 0601 apresentou forte arrastamento e ausência de banda nítida, sugerindo degradação do DNA, amplificação inespecífica ou interferência por contaminantes. Dada a impossibilidade de interpretar os resultados com fiabilidade, este gene foi excluído das análises posteriores.

No caso do gene 0302, observou-se uma banda única, bem definida e com um tamanho aproximado de 1500 bp, valor muito próximo do tamanho teórico esperado (1391 bp). Este resultado sugere uma amplificação específica e eficiente, pelo que o gene foi selecionado para continuar nas etapas seguintes.

Para o gene 0300, foram observadas duas bandas distintas, sendo a mais intensa aproximadamente 750 bp, compatível com o tamanho esperado (637 bp). A presença de uma segunda banda poderá dever-se à amplificação de regiões inespecíficas ou produtos secundários, como dímeros de *primers*. No entanto, a banda predominante, próxima do tamanho previsto, justificou a sua inclusão numa etapa de otimização.

Relativamente ao gene 0102, a eletroforese revelou múltiplas bandas com arrastamento pronunciado, o que poderá indicar amplificação inespecífica, presença de produtos degradados ou concentração inadequada dos reagentes de PCR. A baixa qualidade do perfil obtido levantou dúvidas quanto à fiabilidade da amplificação.

O gene 0201 apresentou uma banda bem definida com tamanho inferior a 250 bp, inferior ao valor esperado (1372 bp), acompanhada de arrastamento. Estes dados poderão refletir uma amplificação parcial ou a presença de fragmentos degradados. Apesar da banda ser visível, a discrepância entre o tamanho observado e o esperado fez com que não fosse escolhido para qPCR.

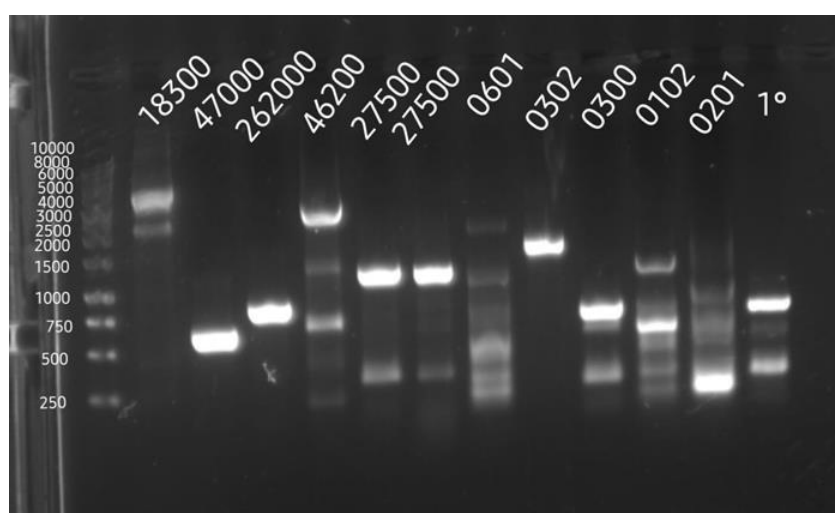


Figura 5- Visualização por eletroforese em gel de agarose dos resultados da amplificação dos 5 genes candidatos por PCR. Marcador: 1 kb DNA Ladder ready-to-use (BIORON).

Face aos resultados obtidos, procedeu-se à otimização da temperatura de *annealing* para 55°C nos genes 0300 e 0102, com o objetivo de melhorar a especificidade da reação. Após a repetição da PCR e eletroforese, o gene 0302 manteve o perfil anteriormente observado, confirmando a sua reprodutibilidade e qualidade de amplificação (Figura 6). No entanto, o gene 0300, que anteriormente havia mostrado uma banda intensa e próxima do tamanho previsto, não apresentou qualquer banda visível após a otimização, o que pode dever-se a diminuição excessiva da eficiência de *annealing* dos *primers* ou degradação do cDNA. O gene 0102 manteve o padrão com arrastamento, indicando que a otimização térmica não foi suficiente para garantir a especificidade da amplificação. Perante estes resultados, foram selecionados os genes 0302 pela sua consistência e especificidade e 0300 que, apesar da falha na segunda amplificação, revelou uma

banda intensa e próxima do tamanho esperado na primeira análise para posterior análise de expressão por qPCR.

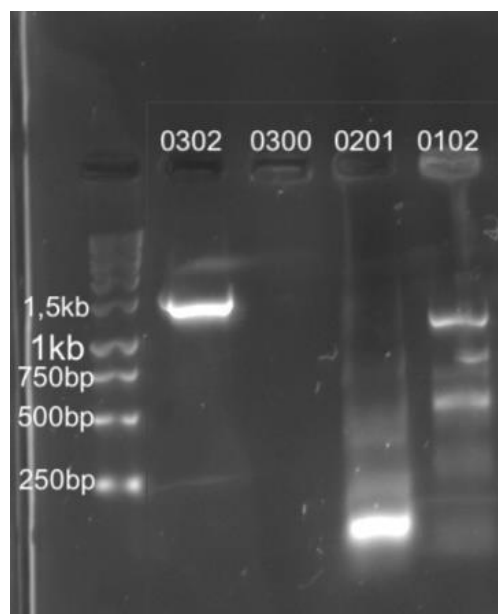


Figura 6 - Visualização por eletroforese em gel de agarose dos resultados da amplificação de 4 genes candidatos por PCR. Marcador: 1 kb DNA Ladder ready-to-use (BIORON).

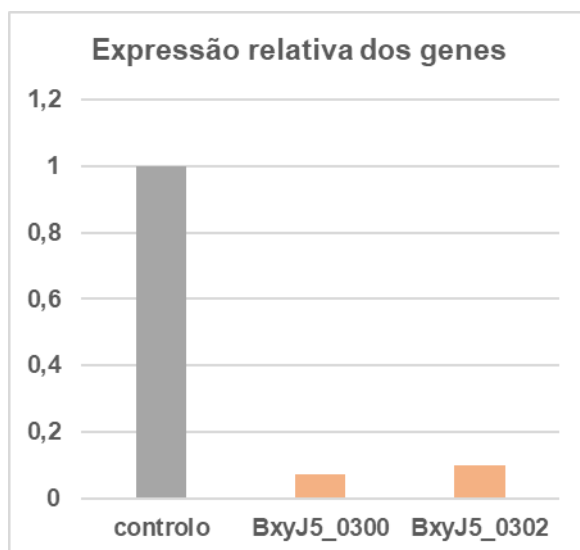
#### 5.4. Análise da expressão relativa dos genes candidatos

Com o objetivo de avaliar o efeito do silenciamento do fator de transcrição (TF) na expressão de dois dos genes candidatos validados, foi realizada uma análise de expressão relativa por RT-qPCR. Esta técnica permite quantificar com elevada sensibilidade e especificidade a variação na expressão de transcritos entre diferentes condições experimentais. A reação foi preparada numa placa de 96 poços, utilizando a química baseada em SYBR Green, um corante intercalante fluorescente que permite a deteção da amplificação em tempo real. Os valores de Ct (*cycle threshold*) obtidos correspondem ao número de ciclos necessários para que a fluorescência ultrapasse o limiar de deteção e foram utilizados para calcular a expressão relativa dos genes através do método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , conforme descrito por Livak e Schmittgen (2001) (Livak & Schmittgen, 2001).

Para cada gene de interesse, a expressão foi normalizada em relação ao gene de referência (actina), permitindo compensar variações técnicas entre amostras. Em seguida, a condição de tratamento (silenciamento do TF) foi comparada à condição assumida

como expressão basal (valor = 1). Valores inferiores a 1 indicam diminuição da expressão em relação ao controlo, enquanto valores superiores a 1 indicam aumento.

Os resultados ([Figura 7](#)) mostraram que ambos os genes analisados (BxyJ5\_0300 e BxyJ5\_0302) apresentaram uma redução da expressão sob a condição de silenciamento do TF. Este padrão sugere que a presença do TF é necessária para a expressão normal destes genes, apontando para uma possível regulação positiva direta ou indireta. Na primeira abordagem, foram analisadas as réplicas individualmente. Os valores de expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) obtidos indicaram uma redução da expressão dos dois genes no tratamento, em comparação com o controlo. Valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  inferiores a 1 indicam que houve uma diminuição da expressão em relação ao controlo, o que pode significar que o TF atua como um regulador positivo da transcrição destes genes.



*Figura 7 - Comparação da expressão relativa de cada gene entre as condições em estudo.*

Esta tendência foi observada de forma consistente em ambas as réplicas, sugerindo que o silenciamento do TF teve um impacto direto na expressão destes genes. A diminuição da sua expressão em resposta à ausência do TF indica que a presença deste fator pode ser necessária para a ativação da transcrição dos genes, o que será relevante para futuras análises funcionais.

## 6. Conclusões

Durante o estágio, foi avaliada a influência de um fator de transcrição na regulação de genes no nemátode fitoparasita *Bursaphelenchus xylophilus*. Utilizou-se RT-qPCR para medir a expressão relativa de genes específicos, normalizando com o gene referência actina, e aplicando o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  para análise dos resultados. Em conjunto, os resultados indicam que o fator de transcrição em estudo exerce um papel regulatório importante sobre genes que potencialmente influenciam a capacidade do nemátode de sobreviver e causar danos ao pinheiro.

Observou-se uma redução significativa na expressão dos genes *BxyJ5\_0300* e *BxyJ5\_0302* após o silenciamento do fator de transcrição. O gene *BxyJ5\_0300* não apresenta domínios de proteínas conhecidos, o que indica que sua função pode ser ainda desconhecida ou que atua de forma não convencional, o que dificulta a predição direta de seu papel biológico. No entanto, a diminuição da sua expressão sugere que este gene pode ter uma função regulada pelo fator de transcrição que, embora não esteja caracterizada por domínios reconhecidos, pode ser importante para processos ainda a elucidar no nemátode.

Por outro lado, o gene *BxyJ5\_0302* codifica uma proteína com domínio da família Peptidase A1, correspondente a proteases ácidas e proteases aspartil eucarióticas. Essas proteínas são frequentemente envolvidas na degradação de proteínas e processos metabólicos importantes, incluindo a modulação da interação do parasita com o hospedeiro, digestão de proteínas do tecido vegetal ou processos de invasão. A redução da expressão deste gene pode, portanto, comprometer a capacidade do nemátode de degradar proteínas essenciais para sua alimentação, desenvolvimento e invasão, reduzindo a sua virulência.

Este trabalho contribui para o aprofundamento do conhecimento sobre os mecanismos moleculares que regulam a patogenicidade do *Bursaphelenchus xylophilus* e pode ser útil para o desenvolvimento de novas estratégias de controlo biológico deste parasita.

## 7. Referências Bibliográficas

- Beers, E. P. ; J. A. M. ; D. A. W. (2023). Phylogenetic and AlphaFold predicted structure analyses provide insights for A1 aspartic protease family classification in *Arabidopsis*. *Biological Chemistry*.
- Bitar, M., Drummond, M. G., Costa, M. G. S., Lobo, F. P., Calzavara-Silva, C. E., Bisch, P. M., MacHado, C. R., MacEdo, A. M., Pierce, R. J., & Franco, G. R. (2013). Modeling the zing finger protein SmZF1 from *Schistosoma mansoni*: Insights into DNA binding and gene regulation. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 39, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.jmglm.2012.10.004>
- Corrado, G. ; et al. (2020). FAD/NADH Dependent Oxidoreductases: From Different Amino Acid Dehydrogenases to Flavoproteins. *Journal of Clinical Medicine*.
- Ekino, T. ; K. H. ; K. N. ; S. R. (2020). Ultrastructural plasticity in the plant-parasitic nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Scientific Reports*, 10.
- Espada, M., Eves-van den Akker, S., Maier, T., Paramasivan, V., Baum, T., Mota, M., & Jones, J. T. (2018). STATAWAARS: A promoter motif associated with spatial expression in the major effector-producing tissues of the plant-parasitic nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *BMC Genomics*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4908-2>
- Espada, M., Filipiak, A., Li, H., Shinya, R., & Vicente, C. S. L. (2022). Editorial: Global occurrence of pine wilt disease: Biological interactions and integrated management. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.993482>
- Espada, M., Silva, A. C., Eves van den Akker, S., Cock, P. J. A., Mota, M., & Jones, J. T. (2016). Identification and characterization of parasitism genes from the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* reveals a multilayered detoxification strategy. *Molecular Plant Pathology*, 17(2), 286–295. <https://doi.org/10.1111/mpp.12280>
- Eves-van den Akker, S. (2021). Plant–nematode interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 62, 102035. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102035>
- Haerty, W., Artieri, C., Khezri, N., Singh, R. S., & Gupta, B. P. (2008). Comparative analysis of function and interaction of transcription factors in nematodes:

- Extensive conservation of orthology coupled to rapid sequence evolution. *BMC Genomics*, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-399>
- 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. In *Molecular Plant Pathology* (Vol. 14, Issue 9, pp. 946–961). <https://doi.org/10.1111/mpp.12057>
- Kim, B.-N., Kim, J. H., Ahn, J.-Y., Kim, S., Cho, B.-K., Kim, Y.-H., & Min, J. (2020). A short review of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 12(4), 297–304. <https://doi.org/10.1007/s13530-020-00068-0>
- Li, Y.-X. ; M. F.-L. ; D. X. ; W. X. ; F. Y.-Q. ; Z. W. ; P. L. ; Z. X.-Y. (2022). Comprehensive Analysis of Copy Number Variations on Glycoside Hydrolase 45 Genes among Different *Bursaphelenchus xylophilus* Strains. *International Journal of Molecular Sciences*, 23.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Mota, M. M., Braasch, H., Bravo, M. A., Penas, A. C., Burgermeister, W., Metge, K., & Sousa, E. (1999). First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology*, 1(7), 727–734. <https://doi.org/10.1163/156854199508757>
- Ngwa, C.; Farrukh, A.; Pradel, G. Zinc Finger Proteins of Plasmodium Falciparum. *Cell Microbiol* 2021, 23, no12, doi:10.1111/cmi.13387.
- Pires, D., Vicente, C., Faria, J., Mota, M., & Inacio, M. L. (2022). *Pinhal sustentável: o combate ao nemátode da madeira do pinheiro com fungos antagonistas*. 72–77.
- Robertson, L., Cobacho Arcos, S., Escuer, M., Santiago Merino, R., Esparrago, G., Abelleira, A., & Navas, A. (2011). Incidence of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* Steiner & Buhrer, 1934 (Nickle, 1970) in Spain. *Nematology*, 13(6), 755–757. <https://doi.org/10.1163/138855411X578888>
- Seetharam, A., & Stuart, G. W. (2013). A study on the distribution of 37 well conserved families of C2H2 zinc finger genes in eukaryotes. *BMC Genomics*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-420>
- Sousa, E., Bravo, M. A., Pires, J., Naves, P., Penas, A. C., Bonifácio, L., & Mota, M. M. (2001). *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda; Aphelenchoididae) associated with *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera; Cerambycidae) in Portugal. *Nematology*, 3(1), 89–91. <https://doi.org/10.1163/156854101300106937>
- Tong-Yue Wen ;Xin-Yu Wang ;Xiao-Qin Wu ; Jian-Ren Ye. (2024). *Transcriptomic Profiling Reveals That the Differentially Expressed PtNAC9 Transcription Factor Stimulates the Salicylic Acid Pathway to Enhance the Defense Response against Bursaphelenchus xylophilus in Pines*.

Vicente, C., Espada, M., Vieira, P., & Mota, M. (2012). Pine Wilt Disease: A threat to European forestry. In *European Journal of Plant Pathology* (Vol. 133, Issue 1, pp. 89–99). Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9924-x>

Vicente, C. S. L., Soares, M., Faria, J. M. S., Espada, M., Mota, M., Nóbrega, F., Ramos, A. P., & Inácio, M. L. (2022a). Fungal Communities of the Pine Wilt Disease Complex: Studying the Interaction of Ophiostomatales With *Bursaphelenchus xylophilus*. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.908308>

Vicente, C. S. L., Soares, M., Faria, J. M. S., Espada, M., Mota, M., Nóbrega, F., Ramos, A. P., & Inácio, M. L. (2022b). Fungal Communities of the Pine Wilt Disease Complex: Studying the Interaction of Ophiostomatales With *Bursaphelenchus xylophilus*. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.908308>