



UNIVERSIDADE
DE ÉVORA

Departamento de Química e Bioquímica

Curso de Licenciatura em Bioquímica

**Validação de genes relacionados com o
parasitismo do nemátode da madeira do
pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*, através de
hibridação *in situ*.**

Relatório de estágio

Realizado por: Maria Catarina Prates

Orientadores:

Doutora Margarida Espada

Madalena Mendonça

Évora

2023



UNIVERSIDADE
DE ÉVORA

Departamento de Química e Bioquímica

Curso de Licenciatura em Bioquímica

**Validação de genes relacionados com o
parasitismo do nemátode da madeira do
pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*, através de
hibridação *in situ*.**

Relatório de estágio

Realizado por: Maria Catarina Prates

Orientadores:

Doutora Margarida Espada

Madalena Mendonça

Évora

2023

“Este trabalho não inclui as observações do júri”

Agradecimentos

Quero agradecer em primeiro lugar às minhas orientadoras, Doutora Margarida Espada e Madalena Mendonça, por me acolherem no Laboratório de Nematologia, pela paciência e dedicação, pelos conhecimentos que me transmitiram ao longo do estágio, simpatia, cuidado e encorajamento. Obrigada pela oportunidade e total liberdade para aprender mais.

Quero expressar o meu agradecimento à Universidade de Évora, à comissão de curso da licenciatura em Bioquímica e aos docentes pelo inesquecível percurso académico cheio de aprendizagens. Aos colegas que se cruzaram comigo e que proporcionaram estes incríveis três anos cheios de memórias, conquistas e alegrias. Um abraço apertado, à Ana Marta, Carolina, Beatriz e Inês pelo apoio incondicional, companheirismo e doçura. Obrigada por me deixarem fazer parte das vossas vidas e acompanhar a vossa evolução.

Às minhas amigas de coração, Helena e Isabel, que mesmo longe estão sempre a torcer por mim, obrigada por estarem presentes nos momentos mais felizes e especiais.

Por fim, para a minha família, não tenho palavras, são o meu maior apoio e orgulho. Obrigada por me acompanharem nesta aventura e pelo amor que me dão diariamente. Quero agradecer, especialmente à minha mãe pelas palavras sinceras e de força, por estar sempre ao meu lado e por acreditar sempre nas minhas capacidades. Obrigada ao Rui pela sensibilidade, preocupação, compreensão, carinho e por me tirar sempre um sorriso.

Resumo

O nemátode da madeira do pinheiro (NMP), *Bursaphelenchus xylophilus*, é um endoparasita migratório responsável pela doença da murchidão do pinheiro (DMP) que tem impacto na biodiversidade e economia do sistema florestal. Durante a interação com o seu hospedeiro, o NMP secreta diferentes tipos de proteínas, expressas na sua maioria nas glândulas esofágicas, que o ajudam na migração, supressão das defesas e manipulam da planta para o seu benefício. Com base num estudo anterior do transcriptoma das glândulas esofágicas, foram selecionados seis genes abundantemente expressos nestes tecidos. Neste trabalho pretende-se analisar, caracterizar preditivamente e validar um conjunto de potenciais genes envolvidos no parasitismo, utilizando várias técnicas de biologia molecular (amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR), eletroforese em gel de agarose e amplificação por reação em cadeia de polimerase com transcrição reversa quantitativa (RT-PCR)). Para compreender a sua possível função no parasitismo localizou-se a expressão dos genes candidatos nos tecidos do NMP, utilizando uma técnica de hibridação *in situ*.

Os seis genes candidatos foram validados no genoma e transcriptoma do NMP. Todas as proteínas codificadas têm a presença de um sinal peptídico no N-terminal que indica que, possivelmente, serão secretadas no hospedeiro. Os domínios das proteínas foram identificados como proteases aspárticas A1 (BUX_00713_957 e BUX_01281_82), endoglucanase (BUX_00397_6) e alfa amílase (BUX_00422_152). Para os genes BUX_00713_957, BUX_01281_82, BUX_00422_33, gene BUX_00422_152 foi possível detetar o sinal da sua expressão no intestino. Para o gene BUX_00397_6 (glicosil hidrolase família GH45) foi detetado um sinal nas glândulas esofágicas onde possivelmente é secretado pelo estilete e, uma vez no hospedeiro, terá a função de degradar a parede celular. Para o gene BUX_00351_434 não foi possível caracterizar-se o seu domínio proteico nem confirmar o tecido onde é expresso. Esta proteína pode ser específica deste nemátode e desempenhar um papel crucial no parasitismo. Neste sentido, a análise destas proteínas de parasitismo é importante para compreender a sua função na interação parasita-hospedeiro.

Palavras-Chave

Bursaphelenchus xylophilus, nemátodes parasitas de plantas, doença da murchidão do pinheiro, proteínas de parasitismo, hibridação *in situ*.

Abstract

The pinewood nematode (PWN), *Bursaphelenchus xylophilus*, is a migratory endoparasite responsible for pine wilt disease (PWD) that impacts the biodiversity and economy of the forest system. During the interaction with its host, PWN secretes different types of proteins, mostly expressed in the pharyngeal gland cells, which help the parasite to migrate, suppress defenses and manipulate the plant for its benefit. Based on a previous study of the transcriptome of the pharyngeal gland cells, six genes abundantly expressed in these tissues were selected. In this work, we intended to analyze, predictively characterize and validate a set of potential genes involved in parasitism, using several molecular biology techniques (polymerase chain reaction (PCR) amplification, electrophoresis in agarose gel, reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) amplification). In order to understand their possible role in parasitism, the expression of candidate genes was localized in the PWN tissues, using an *in situ* hybridization technique.

The six candidate genes were validated in the genome and transcriptome of the PWN. All encoded proteins have the presence of a peptide signal at the N-terminus that indicates that they will possibly be secreted in the host. The protein domains were identified as aspartic proteases A1 (BUX_00713_957 and BUX_01281_82), endoglucanase (BUX_00397_6) and alpha amylase (BUX_00422_152). For the genes BUX_00713_957, BUX_01281_82, BUX_00422_33, BUX_00422_152 it was possible to detect the signal of their expression in the intestine. For the gene BUX_00397_6 (glycosyl hydrolase family GH45) a signal was detected in the pharyngeal gland cells where it is possibly secreted by the stylet and, once in the host, it will have the function of degrading the cell wall. For the gene BUX_00351_434, it was not possible to characterize its protein domain or confirm the tissue where it is expressed. This protein may be specific to this nematode and play a crucial role in parasitism. In this sense, the analysis of these parasitism proteins is important to understand their role in the parasite-host interaction.

Keywords

Bursaphelenchus xylophilus, plant parasitic nematodes, pine wilt disease, parasitism proteins, *in situ* hybridization.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Palavras-Chave	iv
Abstract	v
Keywords	v
Índice de figuras	viii
Índice de tabelas	x
Lista de abreviaturas	xi
1. Problemática	1
2. Objetivos do trabalho	2
3. Revisão bibliográfica	2
3.1. Nemátodes parasitas de plantas	2
3.2. Nemátode da madeira do pinheiro	4
3.2.1. Ciclo de vida de <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	5
3.2.2. Interação do nemátode da madeira do pinheiro com o hospedeiro	6
4. Metodologia experimental	9
4.1. Caracterização e identificação dos genes candidatos para os estudos – análise <i>in silico</i>	9
4.1.1. Análise preditiva das sequencias dos genes.....	10
4.1.2. Análise preditiva do domínio da proteína	10
4.2. Validação dos genes candidatos	10
4.2.1. Extração dos nemátodes da madeira do pinheiro de cultura	11
4.2.2. Extração, purificação e quantificação do DNA genómico do NMP.....	12
4.2.3. Desenho dos <i>primers</i> para amplificação dos genes por PCR	13
4.2.4. Amplificação por PCR.....	13
4.2.5. Validação dos resultados por eletroforese em gel de agarose	15
4.2.6. Síntese da cadeia simples de cDNA, amplificação dos transcritos por RT-PCR e validação por eletroforese em gel de agarose	15
4.2.7. Purificação dos produtos PCR e sequenciação direta pelo método de Sanger.....	16
4.3. Validação da expressão dos genes nos tecidos dos nemátodes por hibridação <i>in situ</i>	17
4.3.1. Desenho dos <i>primers</i> e amplificação dos fragmentos por RT-PCR	17

4.3.2.	Síntese das sondas com a Digoxigenina.....	18
4.3.3.	Fixação e corte dos NMP	18
4.3.4.	Permeabilização, hibridação e visualização das sondas nos tecidos do NMP	19
4.4.	Diagrama do trabalho experimental.....	21
5.	<i>Resultados experimentais e discussão.....</i>	21
5.1	Caracterização e identificação dos genes candidatos para estudos.....	21
5.2	Validação dos genes candidatos	27
5.3	Localização da expressão dos genes nos tecidos dos nemátodes por hibridação <i>in situ</i>	28
6.	<i>Conclusões</i>	32
7.	<i>Referências bibliográficas.....</i>	33
8.	<i>Anexos</i>.....	38

Índice de figuras

Figura 1: Sintomas da DMP em pinheiros-bravos do género <i>Pinus</i> com a copa seca e acastanhada rodeados de pinheiros assintomáticos com a copa verde localizados em Portugal (adaptado de Vicente <i>et al.</i> , 2021).....	1
Figura 2: Esquema da região anterior (cabeça) de um nemátode fitoparasita onde está representado o estilete e as glândulas esofágicas compostas pela glândula dorsal, GD, e por duas glândulas subventrais, GSV (adaptado de Vieira e Gleason, 2019).	3
Figura 3: Ilustração dos diferentes tipos de parasitismo dos nemátodes fitoparasitas: ectoparasita, endoparasita migratório e sedentário (nemátodes das galhas e dos quistos) (adaptado de Vieira e Gleason, 2019).	3
Figura 4: A) Juvenil do NMP, <i>B. xylophilus</i> , causador da DMP (ampliação 200x) (Leica DMi). B) Adulto macho e adulto fêmea do NMP, <i>B. xylophilus</i> (adaptado de Vicente <i>et al.</i> , 2012).	4
Figura 5: Distribuição da DMP com as áreas afetadas em Portugal continental. O NMP foi pela primeira vez detetado, em 1999, na Península de Setúbal e na década seguinte distribui-se pelas áreas centro do país (adaptado de Rodrigues <i>et al.</i> , 2015).....	5
Figura 6: Ciclo de vida do NMP associado ao inseto vetor. Na transmissão primária, os nemátodes reproduzem-se nas células do córtex e do xilema migrando no seu interior e atingindo uma elevada taxa reprodutiva. Quando a árvore entra em declínio, os recursos vegetais ficam escassos e o nemátode muda para a fase micófago, alimentando-se dos fungos endófitos da planta. Na transmissão secundária, os nemátodes são atraídos para as câmaras pupais dos insetos na forma de JIII e entram num estado de desenvolvimento especial JIV, a larva de dauer. Quando o inseto adulto eclode os nemátodes vão dentro do seu corpo, propagando assim a DMP (adaptado de Vicente e Inácio, 2021).	5
Figura 7: A) Fotografias de uma histologia de um caule de pinheiro infetado com a DMP onde se observa canais resinosos corticais e axiais destruídos (DCD e DAD), a zona cambial (CC) aumentada, o tecido medular completamente destruído (P) e nemátodes (N) na região da medula e zona cambial (adaptado de Rodrigues <i>et al.</i> ,2021). B) Pinheiro-bravo (<i>Pinus pinaster</i>) com sintomas da doença da murchidão do pinheiro (do lado esquerdo) - caracterizado pelo amarelecimento e murchidão das agulhas - na Península de Setúbal, 30 km a SE de Lisboa (adaptado de Vicente <i>et al.</i> , 2012). C) Fotografia de uma histologia de um caule de pinheiro sem sinais de degradação celular rodeados por células epiteliais intactas, com canais resinosos corticais (CD), canais resinosos radiais (RD) e canais resinosos axiais (AD) (adaptado de Rodrigues <i>et al.</i> ,2021).	6
Figura 8: Esquema representativo da interação do NMP mediada por proteínas envolvidas no parasitismo e expressas nas glândulas esofágicas (GSV e GD). Estas proteínas são secretadas para o interior das células do hospedeiro através do estilete. Diferentes proteínas envolvidas no parasitismo estão envolvidas na migração, alimentação e defesas do nemátode fitoparasita; outras proteínas que não se sabe qual a sua função e não têm similaridade de sequencia com proteínas disponíveis nas bases de dados públicas (adaptado de Espada <i>et al.</i> , 2022).	7
Figura 9: Placa de petri com meio de cultura PDA e um balão erlenmeyer com cevada A) antes da inoculação do NMP; B) após a inoculação do NMP.	9
Figura 10: A) Meio de cultura da placa de petri com os nemátodes em cima das folhas de papel. B) “Embrulho” feito com as folhas de papel.	11

Figura 11: A) A amostra foi crivada (38 μ m) para a reter os nemátodes presentes na água, a partir do método do tabuleiro. Depois recolheu-se o crivo com água destilada para um copo de recolha (B). C) As amostras que continham muitas impurezas filtrou-se num funil de Baermann adaptado para eliminar os resíduos de fungo e recolher os nemátodes.....	11
Figura 12: Tubo eppendorf concentrado de nemátodes da madeira do pinheiro (imagem A). Maceração com o micropilão estéril para matar os nemátodes (imagem B).	12
Figura 13: Preparação da eletroforese em gel de agarose. Berço com o gel de agarose a solidificar na imagem A. Na imagem B observa-se a tina de eletroforese ligada ao gerador de corrente elétrica. Na imagem C observa-se o transiluminador com radiação UV utilizado para documentar os resultados.	15
Figura 14: A) Corte dos NMP com uma lâmina e uma bomba vibratória. B) Coleta dos nemátodes cortados para um tubo de 1,5 mL com o auxílio de uma ponta de uma pipeta com paraformaldeído diluído.	19
Figura 15: A) Tubo eppendorf com coloração amarelada depois da adição da solução NBT/BCIP stock. B) e C) Local horizontal onde se colocou os tubos durante a noite.	20
Figura 16: A) Tubos eppendorfs com as sondas sense e antisense hibridizadas com cor roxa. B) e C) Preparação temporária com os nemátodes. D) Microscópio utilizado para visualizar os resultados.	20
Figura 17: Esquema ilustrativo da metodologia experimental do estudo.....	21
Figura 18: Esquema ilustrativo do tamanho esperado dos intrões e exões nas sequências genómicas em estudo.	23
Figura 19: Resultados obtidos da validação por eletroforese em gel de agarose da amplificação dos seis genes em estudo. Legenda: BUX_00351_434 (A), BUX_00713_957 (B), BUX_00422_33 (C), BUX_00422_152 (D), BUX_00397_6 (E) e BUX_01281_82 (F). Marcador utilizado: 1 Kb DNA Ladder ready-to-use (BIORON).	27
Figura 20: Resultados da amplificação dos transcritos dos genes candidatos por RT-PCR e visualização por eletroforese em gel de agarose. Os fragmentos de todos os genes foram validados e os tamanhos estão compreendidos entre 300bp e 700bp. Legenda: BUX_00351_434 (1), BUX_00713_957 (2), BUX_00422_33 (3), BUX_00422_152 (4), BUX_00397_6 (5) e BUX_01281_82 (6). Marcador utilizado: 1 Kb DNA Ladder ready-to-use (BIORON).....	28
Figura 21: Resultado obtido para a validação das sondas sense e antisense incorporadas com a DIG por eletroforese em gel de agarose. As sondas antisense estão numeradas e as sondas sense estão indicadas por letras. Legenda: BUX_00351_434 (1 e A), BUX_00713_957 (2 e B), BUX_00422_33 (3 e C), BUX_00397_6 (4 e D), BUX_01281_82 (5 e E), BUX_01281_82 (6 e F) e BUX_00119_44 (ENG). Marcador utilizado: NZYDNA Ladder V.	29
Figura 22: Imagens obtidas ao microscópio ótico <i>OLYMPUS BX50</i> , da técnica de hibridação <i>in situ</i> que tem como objetivo localizar os genes candidatos nos tecidos do nemátode. Legenda das sondas antisense: BUX_00351_434 (A e B), BUX_00713_957 (C); BUX_00422_33 (D); BUX_00422_152 (E); BUX_00397_6 (F); BUX_01281_82 (G) e BUX_00119_44 (H). Legenda das sondas sense: BUX_00397_6 (J). Ampliação das imagens A, B,C e G é de 100x e das imagens D,E,F,H e J é de 200x.	30

Índice de tabelas

Tabela 1: Volumes e concentrações finais otimizadas e utilizadas para cada solução no PCR.	14
Tabela 2: Amplificação dos transcritos a partir do cDNA por RT-PCR com a utilização dos seguintes volumes otimizadas e as respectivas concentrações finais.....	16
Tabela 3: Volumes e concentrações finais dos reagentes utilizados para realizar o RT-PCR para amplificar os fragmentos para a hibridação in situ.....	17
Tabela 4: Caracterização dos genes candidatos em estudo utilizando modelos preditivos (análise in silico).	22
Tabela 5: Similaridade das sequencias proteicas em estudo com todos os nemátodes estudados e conhecidos atualmente realizado no Wormbase Parasite.....	25
Tabela 6: Resultados obtidos para a similaridade das sequencias proteicas em estudo com todos os organismos publicados na base de dados do NCBI.....	26

Lista de abreviaturas

AD	Canais resinosos axiais (do inglês, axial resin ducts)
CC	Zona cambial (do inglês, cambial zone)
CD	Canais resinosos corticais (do inglês, cortical resin ducts)
DAD	Canais resinosos axiais destruídos (do inglês, destroyed axial resin ducts)
DCD	Canais resinosos corticais destruídos (do inglês, destroyed cortical resin ducts)
DIG	Digoxigenina
DMP	Doença da murchidão do pinheiro (em inglês, pine wilt disease, PWD)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>Desoxyribonucleic acid</i>)
GC	Guanina-citocina
GD	Glândula dorsal
GH	Glicosil hidrolase
GSV	Glândulas subventrais
ISH	Hibridação <i>in situ</i> (do inglês, <i>in situ</i> hybridization)
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mRNA	RNA mensageiro (do inglês, <i>Messenger RNA</i>)
N	Nemátode
NMP	Nemátode da madeira do pinheiro (em inglês, pine wood nematode, PWN)
OEPP	Organização Europeia para a Proteção de Plantas
P	Tecido medular
PDA	Ágar de batata dextrose (do inglês, <i>Potato Dextrose Ágar</i>)
PCR	Reação em cadeia de polimerase (do inglês, <i>Polymerase chain reaction</i>)
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase com transcrição reversa quantitativa, PCR em tempo real (do inglês, <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>)
RD	Canais resinosos radiais (do inglês, radial resin ducts)
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês, <i>Ribonucleic acid</i>)
SSC	Citrato salino-sódio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SP	Sinal peptídico

TBE
TM

Tris/Ácido Bórico/EDTA
Temperatura de *melting*

1. Problemática

O nemátode da madeira do pinheiro (NMP), *Bursaphelenchus xylophilus*, Steiner & Buhner, 1934, (Nickle, 1970) é um fitoparasita migratório responsável pela doença da marchidão do pinheiro (DMP). O NMP é endémico da América do Norte onde não causa danos severos às espécies de árvores nativas, no entanto, no início do século XX foi detetado no leste da Ásia (Japão, China, Coreia) onde causou danos significativos nalgumas espécies de pinheiros (Jones *et al.*, 2008; Vicente *et al.*, 2012; Jones *et al.*, 2013). Esta doença é uma das maiores ameaças para as florestas de coníferas em todo mundo, causando sintomas como os observados na **Figura 1** e morte das árvores, com um impacto muito grande no sector socioeconómico e ecológico (diminuição da biodiversidade florestal) nos países afetados.



Figura 1: Sintomas da DMP em pinheiros-bravos do género *Pinus* com a copa seca e acastanhada rodeados de pinheiros assintomáticos com a copa verde localizados em Portugal (adaptado de Vicente *et al.*, 2021).

Na Europa este nemátode está listado como um organismo de quarentena A2 pela Organização Europeia para a Proteção de Plantas (OEPP) (Bulletin OEPP, 2013). Em Portugal, a Fileira do Pinho representou, no ano de 2021, 3,4% das exportações nacionais e 37% das exportações das indústrias da Fileira Florestal (Centro Pinus, 2022). Devido ao aumento do transporte de madeira infetada e desenvolvimento biológico do inseto-vetor, a DMP foi detetada pela primeira vez em Portugal em 1999 e dispersou pelo centro do país, ilha da Madeira e por Espanha (Mota *et al.*, 1999; Robertson *et al.*, 2011; Fonseca *et al.*, 2012). Com a rápida propagação da infeção por vários países, é necessário ter uma estratégia de controlo que não dependa de pesticidas, mas que inclua uma solução sustentável para o combate de diferentes variáveis da doença (Espada *et al.*, 2022). A amostragem e abate de árvores em declínio, o tratamento térmico da madeira destinada à circulação dentro e fora de Portugal, a fiscalização do cumprimento das normativas em vigor por parte das autoridades e a sensibilização do público para esta doença são algumas das medidas

preventivas de estratégia nacional que ajudam no combate e prevenção da DMP (Vicente e Inácio, 2021; Espada *et al.*, 2022).

Este trabalho foca-se no estudo dos mecanismos moleculares de parasitismo do nemátode e na sua interação com o hospedeiro através de um conjunto de genes candidatos do transcriptoma do NMP potencialmente envolvidos na infeção. Se se compreender como possivelmente atuam as potenciais proteínas no parasitismo através de estudos funcionais, futuramente pode encontrar-se soluções para o controlo deste fitoparasita.

2. Objetivos do trabalho

Este trabalho tem como objetivo analisar, caracterizar e validar um conjunto de genes candidatos, previamente selecionados a partir dos dados obtidos do transcriptoma do NMP, *Bursaphelenchus xylophilus*, que estão potencialmente envolvidos no parasitismo. Para compreender o papel dos genes candidatos no parasitismo, os objetivos específicos do trabalho são:

- Caracterização *in silico* dos genes, transcritos e do domínio catalítico das proteínas codificadas;
- Validação da expressão dos genes no genoma e dos transcritos no transcriptoma;
- Validação da expressão dos genes de interesse nos tecidos dos nemátodes através da técnica de hibridação *in situ* (ISH).

Para cumprir estes objetivos foram aplicadas diversas técnicas de biologia molecular e nematológicas: análise preditiva de genes e proteínas; protocolos experimentais para amplificar e analisar genes do nematode a partir de diferentes ácidos nucleicos (RNA e DNA); protocolo experimental *in situ* para o processo de hibridação de sondas nos tecidos do NMP.

3. Revisão bibliográfica

3.1. Nemátodes parasitas de plantas

Os nemátodes parasitas de plantas infetam plantas agrícolas e florestas de grande importância económica e ecológica. Possuem uma estrutura alongada e cilíndrica com sistema digestivo, reprodutor e nervoso que lhes permitem executar de forma bem-sucedida o seu papel como parasita no hospedeiro de interesse (Perry e Moens, 2011).

Uma característica morfológica única dos nemátodes fitoparasitas é a presença de um estilete, na região anterior, uma estrutura em forma de agulha, conforme ilustrado na **Figura 2**, que apresenta uma dupla função: mecânica por destruir as paredes celulares e química por apresentar um tubo oco que permite secretar proteínas do nemátode dentro das células vegetais (Perry e Moens, 2011; Vieira e Gleason, 2019).



Figura 2: Esquema da região anterior (cabeça) de um nemátode fitoparassita onde está representado o estilete e as glândulas esofágicas compostas pela glândula dorsal, GD, e por duas glândulas subventrais, GSV (adaptado de Vieira e Gleason, 2019).

As diferentes espécies de nemátodes fitoparasitas podem ser categorizadas de acordo com o seu estilo de parasitismo como: i) ectoparasitas que migram no solo sem nunca entrar no hospedeiro e usam as raízes como fonte de alimentação; ii) endoparasitas migratórios que entram, migram e se alimentam dentro das células do hospedeiro; iii) sedentários (nemátodes das galhas e dos quistos) que se alimentam e reproduzem, formando estruturas complexas de alimentação mantendo o hospedeiro vivo (Jones *et al.*, 2008; Haegeman *et al.*, 2012; Jones *et al.*, 2013). Na **Figura 3** está indicado os diferentes estilos de parasitismo descritos anteriormente.

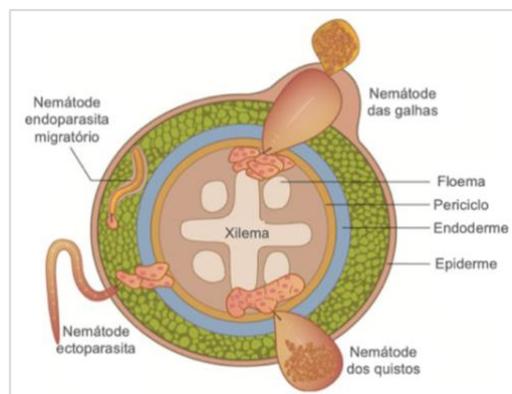


Figura 3: Ilustração dos diferentes tipos de parasitismo dos nemátodes fitoparasitas: ectoparasita, endoparasita migratório e sedentário (nemátodes das galhas e dos quistos) (adaptado de Vieira e Gleason, 2019).

3.2. Nemátode da madeira do pinheiro

O NMP, *Bursaphelenchus xylophilus*, Steiner & Buhner, 1934, (Nickle, 1970), observado na **Figura 4**, é um endoparasita migratório responsável pela DMP. Esta doença resulta de uma complexa interação biológica entre o agente patogénico (NMP), o seu inseto vetor (inseto do género *Monochamus galloprovincialis* que permite o transporte e dispersão do nemátode), e o hospedeiro (espécies de pinheiros do género *Pinus*) (Sousa *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2008; Vicente *et al.*, 2012; Futai, 2013). Esta espécie distingue-se de outras espécies de nemátodes fitoparasitas devido ao seu modo de alimentação *duo* -micetófago e fitófago- alimenta-se das células do hospedeiro quando os tecidos vegetais estão saudáveis (fase fitófago) e alimenta-se dos fungos endófitos presentes na árvore quando esta se encontra em declínio (fase micófago). O modo de alimentação *duo* permite-lhe sobreviver e reproduzir-se sexualmente no hospedeiro numa fase avançada da doença, quando a árvore já se encontra em declínio e não há alimento disponível (Vicente *et al.*, 2012; Espada *et al.*, 2016). Todos os estados de vida do NMP são fitófagos (com exceção do ovo) e desenvolvem-se no hospedeiro.

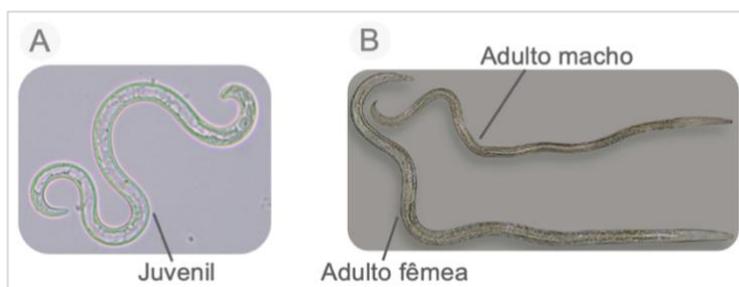


Figura 4: A) Juvenil do NMP, *B. xylophilus*, causador da DMP (ampliação 200x) (Leica DMi). B) Adulto macho e adulto fêmea do NMP, *B. xylophilus* (adaptado de Vicente *et al.*, 2012).

Apesar dos esforços das Autoridades Fitossanitárias Nacionais, a DMP dispersou para o centro de Portugal continental, conforme indicado na **Figura 5**, Ilha da Madeira e, em 2011, foi detetado em Espanha tornando-se assim um problema fitossanitário de extrema importância para a preservação da indústria e biodiversidade das áreas florestais (Abelleira *et al.*, 2011; Fonseca *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2015).

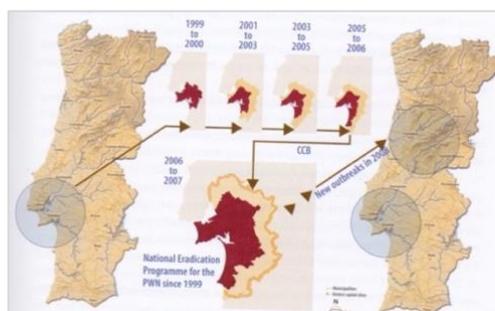


Figura 5: Distribuição da DMP com as áreas afetadas em Portugal continental. O NMP foi pela primeira vez detetado, em 1999, na Península de Setúbal e na década seguinte distribui-se pelas áreas centro do país (adaptado de Rodrigues *et al.*, 2015).

3.2.1. Ciclo de vida de *Bursaphelenchus xylophilus*

De forma a compreender melhor como funciona a infeção e a propagação da DMP, deve conhecer-se a biologia e o ciclo de vida do NMP que está ilustrado na **Figura 6**. Este é composto por quatro estados juvenis (J1 a J4) e por um estado adulto com machos e fêmeas que se reproduzem sexualmente no hospedeiro (Vicente *et al.*, 2012; Vicente e Inácio, 2021).

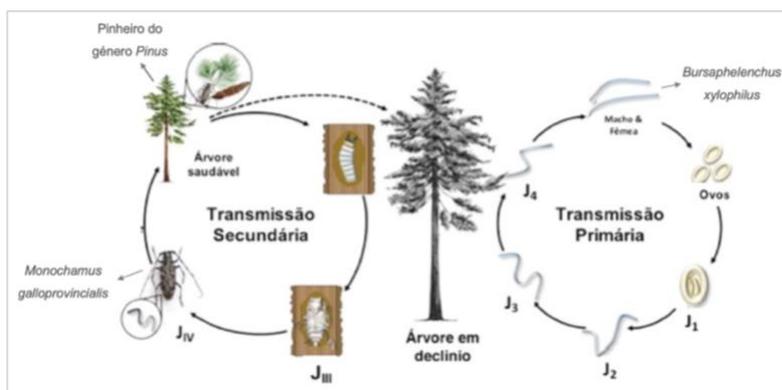


Figura 6: Ciclo de vida do NMP associado ao inseto vetor. Na transmissão primária, os nemátodes reproduzem-se nas células do córtex e do xilema migrando no seu interior e atingindo uma elevada taxa reprodutiva. Quando a árvore entra em declínio, os recursos vegetais ficam escassos e o nemátode muda para a fase micófago, alimentando-se dos fungos endófitos da planta. Na transmissão secundária, os nemátodes são atraídos para as câmaras pupais dos insetos na forma de JIII e entram num estado de desenvolvimento especial JIV, a larva de dauer. Quando o inseto adulto eclode os nemátodes vão dentro do seu corpo, propagando assim a DMP (adaptado de Vicente e Inácio, 2021).

Inicialmente, a infeção pelo NMP nas árvores saudáveis ocorre através da alimentação do inseto-vetor (*Monochamus galloprovincialis*), que transporta o nemátode no seu corpo sem lhe causar qualquer infeção. O fitoparasita entra diretamente no córtex do pinheiro quando o inseto se alimenta. Dentro do hospedeiro, o nemátode alimenta-se e migra nas células do córtex, parênquima e dos canais resinosos ao longo do tronco

da árvore até ao xilema (fase fitófaga) (Jones *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2021). Na **Figura 7A** é possível observar-se os danos que os NMP causa nos canais resinosos e no tecido medular do caule de um pinheiro infetado. Como resultado desta interação ocorre o bloqueio da condução de água no xilema e floema, provocando a redução no fluxo de resina das árvores, o escurecimento das folhas, como ilustrado na **Figura 7B**, e por fim, a morte da árvore. Em condições favoráveis, o nemátode reproduz-se rapidamente podendo completar o ciclo de vida (de ovo a adulto) em apenas 6 dias. À medida que a árvore entra em declínio, o nemátode passa a alimentar-se dos fungos endofíticos presentes nesse hospedeiro (fase micetófaga) (Vicente *et al.*, 2012; Vicente *et al.*, 2021; Vicente e Inácio, 2021).

As árvores mortas ou em declínio são ambientes atrativos para a oviposição do inseto-vetor. Nesta fase, os nemátodes evoluem de JIII (juvenil III de dispersão) para o estado JIV, também conhecido por estágio de *dauer*, onde ocorre a interrupção do processo de alimentação e o parasita é atraído para as câmaras pupais do inseto. Quando o inseto adulto eclode o nemátode é transportado no seu corpo para um hospedeiro saudável (Vicente *et al.*, 2021).

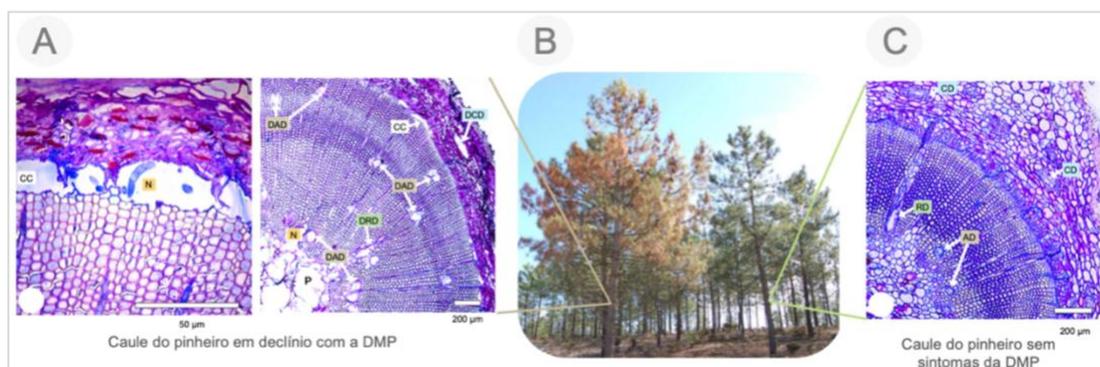


Figura 7: A) Fotografias de uma histologia de um caule de pinheiro infetado com a DMP onde se observa canais resinosos corticais e axiais destruídos (DCD e DAD), a zona cambial (CC) aumentada, o tecido medular completamente destruído (P) e nemátodes (N) na região da medula e zona cambial (adaptado de Rodrigues *et al.*, 2021). B) Pinheiro-bravo (*Pinus pinaster*) com sintomas da doença da murchidão do pinheiro (do lado esquerdo) - caracterizado pelo amarelecimento e murchidão das agulhas - na Península de Setúbal, 30 km a SE de Lisboa (adaptado de Vicente *et al.*, 2012). C) Fotografia de uma histologia de um caule de pinheiro sem sinais de degradação celular rodeados por células epiteliais intactas, com canais resinosos corticais (CD), canais resinosos radiais (RD) e canais resinosos axiais (AD) (adaptado de Rodrigues *et al.*, 2021).

3.2.2. Interação do nemátode da madeira do pinheiro com o hospedeiro

Durante a fase fitófaga, as interações entre o NMP e o hospedeiro são mediadas por proteínas de parasitismo, que têm um papel durante a infeção e contribuem para o sucesso do nemátode. Na sua maioria, estas proteínas são produzidas nas glândulas

esofágicas (duas glândulas subventrais, GSV e uma glândula dorsal, GD) e podem ser secretadas para dentro da planta, como é possível observar na **Figura 8**. O estilete permite perfurar a parede celular vegetal (rígida) durante a migração no tecido vegetal ajudando na secreção das proteínas e na alimentação dos conteúdos citoplasmáticos. As proteínas secretadas têm no seu N-terminal um sinal peptídico (SP) que sinaliza a sua secreção para o exterior das células. A presença do SP e a ausência de domínio transmembranar são dois dos fatores de seleção para as potenciais proteínas envolvidas no parasitismo (para além da expressão diferencial durante a infeção).

As proteínas de parasitismo têm diferentes funções durante a migração e reprodução dos nemátodes nos tecidos vegetais. As suas funções podem estar envolvidas na degradação da parede celular e migração dos nemátodes nos tecidos vegetais e digestão dos conteúdos citoplasmáticos. Na proteção do nemátode contra as defesas da planta como moléculas capazes de detoxificar as moléculas de defesa da planta, suprimir defesas ou manipular as vias de sinalização do hospedeiro (Haegeman et al., 2012; Espada et al., 2016; Vieira e Gleason, 2019; Mathew e Opperman, 2020; Eves van den Akker, 2021; Espada et al., 2022).

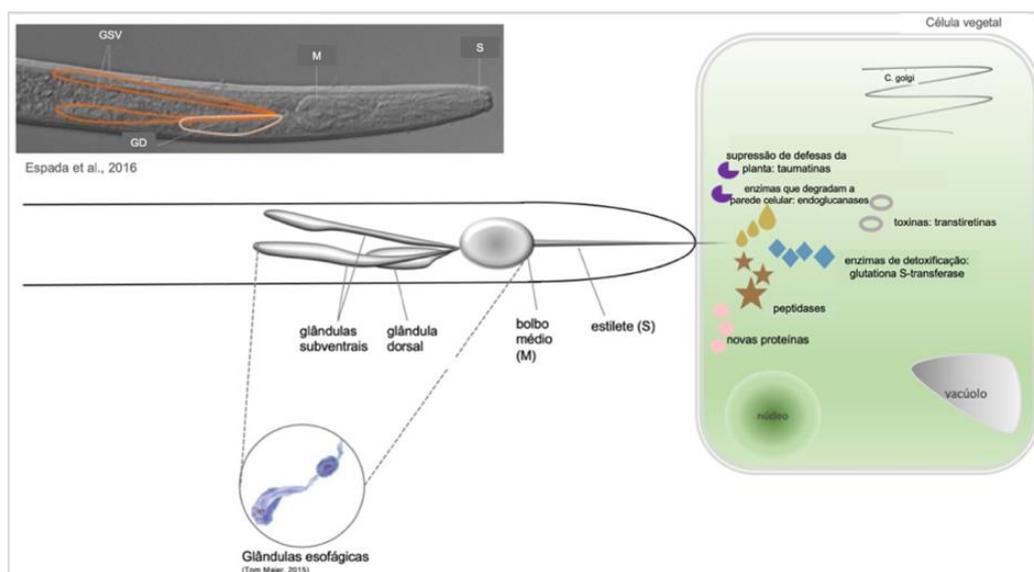


Figura 8: Esquema representativo da interação do NMP mediada por proteínas envolvidas no parasitismo e expressas nas glândulas esofágicas (GSV e GD). Estas proteínas são secretadas para o interior das células do hospedeiro através do estilete. Diferentes proteínas envolvidas no parasitismo estão envolvidas na migração, alimentação e defesas do nemátode fitoparasita; outras proteínas que não se sabe qual a sua função e não têm similaridade de sequência com proteínas disponíveis nas bases de dados públicas (adaptado de Espada *et al.*, 2022).

As novas tecnologias de sequenciação foram fundamentais para o avanço desta área e permitiram gerar uma grande quantidade de dados de genómica, transcriptómica e proteómica. Em estudos anteriores com recurso à sequenciação da nova geração do RNA mensageiro (mRNA) do NMP foram identificados vários genes do nemátode

diferencialmente expressos durante a infecção do hospedeiro e potencialmente envolvidos no parasitismo (Espada *et al.*, 2016; Tsai *et al.*, 2016). Algumas das proteínas de parasitismo do NMP que foram identificadas são altamente expressas durante a interação com o hospedeiro e são potencialmente secretadas nas células vegetais da planta, como indicado na **Figura 8**.

As proteínas codificadas por estes genes têm diferentes funções no parasitismo. Tal como noutros nemátodes fitoparasitas, o NMP tem celulases com capacidade de degradar a parede celular (celulose) para facilitar a migração dos nemátodes pelo hospedeiro. A β -1,4-endoglucanases (celulase) que pertence à família da glicosil hidrolase GH45 é única no NMP (Kikuchi *et al.*, 2011; Espada *et al.*, 2016). Diferentes proteases (cisteína, metalo, aspártica) e lisozimas foram identificadas como altamente expressas no NMP durante a infecção e podem ter funções importantes na alimentação dos conteúdos celulares e também na defesa do nemátode (Espada *et al.*, 2016; Shinya *et al.*, 2021). Outro grupo de genes altamente expressos são codificantes de enzimas de detoxificação, tais como citocromos P450 e glutathione-S-transferase. Algumas das enzimas participantes na via metabólica de detoxificação, que degradam as moléculas exógenas em compostos mais simples e fáceis de metabolizar (Espada *et al.*, 2016b). Outras proteínas que são diferencialmente expressas e estão associadas à virulência do nemátode, tais como a glicosil hidrolase GH30 e também a saposina (*Bx-Sap-1* e *Bx-Sap-2*), podem induzir a morte celular no processo de parasitismo (Hu *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2020, Shinya *et al.*, 2021).

Adicionalmente, identificou-se na lista de genes mais expressos durante o parasitismo, a presença de proteínas codificantes cujo domínio não têm qualquer similaridade de sequencia nas bases de dados públicas e que algumas podem ser específicas deste nemátode. Muitas destas são abundantemente transcritas nas glândulas esofágicas e não se conhece a sua função no parasitismo (Espada *et al.*, 2016; 2018; 2022). O seu estudo é importante para descrever novas proteínas e compreender o seu papel no parasitismo.

Muitas das proteínas envolvidas no parasitismo são produzidas nas glândulas esofágicas, têm a presença de SP e podem ser secretadas pelo estilete para dentro da planta ou transportadas internamente para outros órgãos, desempenhando funções essenciais e necessárias para o sucesso do parasitismo. No NMP, foi também sequenciado este tecido e identificado um novo conjunto de genes relacionados com o parasitismo (Espada *et al.*, 2018). Outros estudos mostraram uma abordagem proteómica sobre o secretoma destes nemátodes (Shynia *et al.*, 2013; Cardoso *et al.*, 2022).

No estudo da interação entre o nemátode e o seu hospedeiro, para compreender o papel dos genes envolvidos no parasitismo é necessário estudar a função das proteínas que codificam. O objetivo destes estudos é demonstrar que um determinado gene(s) de parasitismo tem influência no sucesso da infeção, no entanto, revela-se muito desafiante. Muitas das metodologias utilizadas podem incluir: expressão espacial dos transcritos no NMP e o silenciamento da expressão dos genes (Mantelin *et al.*, 2017).

4. Metodologia experimental

Para a realização deste trabalho é necessário o cultivo do fungo *Botrytis cinerea* em placas de petri com meio de cultura PDA (água de batata dextrose), que posteriormente é inoculado em balões Erlenmeyer com cevada esterilizada, como demonstrado na **Figura 9A**, durante cerca de oito dias a 20-21°C. Após o crescimento do fungo *Botrytis cinerea* em placas de petri com meio de cultura PDA e/ou em balões Erlenmeyer com cevada, o isolado NMP, Bx RefINIAV (proveniente do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Portugal), é inoculado na câmara de fluxo laminar. O nemátode alimenta-se do fungo para se reproduzir e é incubado numa estufa a 25°C durante 7-10 dias no Laboratório de Nematologia, Universidade de Évora. O resultado obtido depois da incubação está demonstrado na **Figura 9B**.

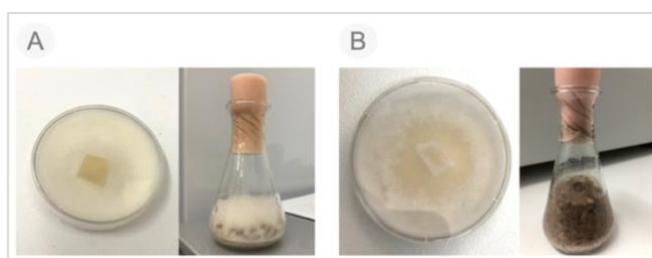


Figura 9: Placa de petri com meio de cultura PDA e um balão erlenmeyer com cevada A) antes da inoculação do NMP; B) após a inoculação do NMP.

4.1. Caracterização e identificação dos genes candidatos para os estudos – análise *in silico*

Num estudo anterior, Espada *et al.* (2018), foi sequenciado o transcriptoma das glândulas esofágicas. A partir da sua análise foi possível identificar uma lista de genes que foram ordenados pela sua abundância. Neste trabalho pretende-se caracterizar seis genes de interesse que pertencem a esta lista. Para cada gene realizou-se as seguintes análises preditivas.

4.1.1. Análise preditiva das sequencias dos genes

Para conhecer e caracterizar de forma geral todos os genes em estudo utilizou-se o *Wormbase ParaSite* (<https://parasite.wormbase.org/index.html>; Howe *et al.*, 2017), uma base de dados dos genomas de todas as espécies de nemátodes atualmente publicadas, que fornece diversas informações sobre a sequência genómica, domínio da proteína, dados genómicos comparativos com outros nemátodes, entre outras. No *software Exon-Intron Graphic Maker* (<http://wormweb.org/exonintron>) realizou-se um esquema ilustrativo com os fragmentos preditivos dos exões (regiões codificantes) e intrões (regiões não codificantes).

4.1.2. Análise preditiva do domínio da proteína

Conhecer o tamanho e a função que a proteína desempenha após ser traduzida é fundamental para compreender o seu papel no parasitismo. O *InterPro* (versão 94.0) (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>; Paysan-Lafosse *et al.*, 2023) usa modelos preditivos para classificar as proteínas funcionalmente agrupando-as em famílias de proteínas. Para identificar o domínio proteico e o sinal peptídico dos seis genes em estudo utilizou-se este programa. O sinal peptídico de cada proteína foi caracterizado através do site *SignalP-6.0* (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>; Teufel *et al.*, 2022). A similaridade das proteínas preditivas em estudo foi comparada nas bases de dados públicas para encontrar sequências já descritas com similaridade (> 70%). Com o *software BLASTP* estudou-se a similaridade com outras espécies de nemátodes (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; Altschul *et al.*, 1990) analisou-se a similaridade com todos os organismos disponíveis na base de dados. Esta análise serve para compreender se a proteína em estudo tem similaridade de sequência com outras proteínas de diferentes organismos e possivelmente se desempenha a mesma função nesse organismo e no NMP.

4.2. Validação dos genes candidatos

Para verificar os parâmetros preditivos analisados dos genes candidatos, nomeadamente se existem no genoma (Kikuchi *et al.*, 2011) e no transcriptoma (Espada *et al.*, 2016) é necessário validá-los experimentalmente utilizando diferentes técnicas de biologia molecular.

4.2.1. Extração dos nemátodes da madeira de pinheiro de cultura

Para realizar a extração e recolha do NMP foi utilizado o método do tabuleiro (como está ilustrado na **Figura 10**). Para extrair nemátodes da placa de petri, retirou-se com uma espátula o meio de cultura e colocou-se no tabuleiro como demonstrado na **Figura 10A**. Para extrair os nemátodes inoculados no balão Erlenmeyer, retirou-se os grãos de cevada e colocou-se no tabuleiro. As amostras são acondicionadas no tabuleiro como apresentado na **Figura 10B** e colocou-se água até submergir a amostra. Deixou-se repousar por 24 horas, à temperatura ambiente.



Figura 10: A) Meio de cultura da placa de petri com os nemátodes em cima das folhas de papel. B) “Embrulho” feito com as folhas de papel.

Após as 24 horas, retirou-se a rede do tabuleiro com a amostra e descartou-se para um contentor biológico. Utilizou-se um crivo de 38 μm (esterilizado) para reter os nemátodes que se encontram na água do tabuleiro como ilustrado na **Figura 11A**. Concentrou-se a amostra de nemátodes com água destilada para um copo de recolha. Quando a amostra recolhida tem resíduos de fungos, pode preparar-se um funil de Baermann adaptado (Southey, 1986) com um filtro de papel como demonstrado na **Figura 11C**. A amostra é colocada no funil durante quatro horas para a mesma passar o filtro. Com o decorrer do tempo os nemátodes passaram o filtro de papel e os resíduos ficaram retidos no funil. Os nemátodes foram recolhidos e guardou-se a amostra no copo de recolha (Bulletin OEPP, 2013).



Figura 11: A) A amostra foi crivada (38 μm) para a reter os nemátodes presentes na água, a partir do método do tabuleiro. Depois recolheu-se o crivo com água destilada para um copo de recolha (B). C) As amostras que continham muitas impurezas filtrou-se num funil de Baermann adaptado para eliminar os resíduos de fungo e recolher os nemátodes.

4.2.2. Extração, purificação e quantificação do DNA genômico do NMP

Para concentrar a amostra, como ilustrado na **Figura 12A**, foi centrifugada (*Centrifuge 5430/5430R, Eppendorf*) a 7830 rpm por 10 a 15 minutos, à temperatura ambiente. Para extrair e isolar o DNA do NMP utilizou-se o *NZY Tissue gDNA Isolation kit (NZYTECH)* e seguiu-se as instruções de acordo com a bula do fabricante. Os nemátodes foram macerados manualmente com um micropilão esterilizado como demonstrado na **Figura 12B**. Para lisar a amostra utilizou-se o *Buffer NT1* e continuou-se a macerar bem a amostra. Adicionou-se 25 µL da *Proteinase K* e incubou-se a 56°C num termobloco (*Thermomixer compact, Eppendorf*), com agitação (400 rpm), durante 2 horas. Para a extração do DNA dos NMP ser bem-sucedida é importante existir: i) uma ação mecânica com o micropilão para esmagar os nemátodes de modo a libertar o seu material genético; ii) uma ação térmica com o calor do banho seco que ajuda na disrupção dos tecidos e iii) uma ação química com o uso de reagentes de lise e a *Proteinase K* que permite a disrupção tanto dos tecidos como das células para libertar o DNA.

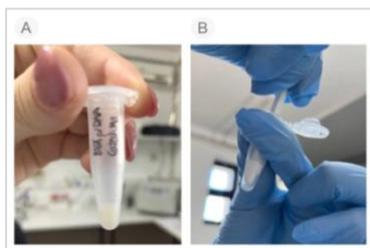


Figura 12: Tubo eppendorf concentrado de nemátodes da madeira do pinheiro (imagem A). Maceração com o micropilão estéril para matar os nemátodes (imagem B).

Adicionou-se *Buffer NL* para precipitar o DNA do lisado. Adicionou-se 100% etanol e aplicou-se a amostra numa minicoluna *NZYSpin Tissue Column*, que tem afinidade para o DNA. Centrifugou-se (*ScanSpeed Mini Microcentrifuge, Eppendorf*) durante 1 minuto a 13,500 rpm e lavou-se com o *Buffer NW1*, para iniciar a limpeza do DNA retido na mini coluna. Centrifugou-se a amostra a 13,500 rpm por 1 minuto e descartou-se o filtrado. Adicionou-se *Buffer NW2* na minicoluna, centrifugou-se a 13,500 rpm por 1 minuto e descartou-se o filtrado. Repetiu-se a lavagem com *Buffer NW2* diluído com etanol 100% e a centrifugação para secar a coluna. Esta etapa é crítica para remover vestígios de etanol que possam interferir na extração de DNA provenientes dos buffers *NL, NW1* e *NW2*. Eluiu-se a amostra com o *Buffer NE* e incubou-se durante 1 minuto à temperatura ambiente. Para eluir a amostra de DNA do NMP, centrifugou-se a 13,500 rpm durante 2 minutos.

Para quantificar o DNA genômico obtido utilizou-se o *Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific)*, um fluorómetro que afere a qualidade e a concentração de moléculas

de DNA, RNA ou proteína. Quantificou-se a amostra de DNA utilizando o *reagente Qubit™ 1X dsDNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific)*. De acordo com as indicações da bula fornecida pelo equipamento, preparou-se dois padrões com *Qubit™ working solution* e S1 e S2, respetivamente. O DNA genómico quantificado foi armazenado a -20°C.

4.2.3. Desenho dos *primers* para amplificação dos genes por PCR

Para amplificar a sequência específica completa de cada gene pela técnica de PCR (reação em cadeia de polimerase), foi necessário desenhar os *primers* (oligonucleótidos) *forward* e *reverse*, utilizando o *software Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator* (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) que, posteriormente, foram sintetizados pela STABvida (<https://www.stabvida.com/pt>), (Portugal). Para cada gene selecionou-se 20-22 nucleótidos no início e no final da sequência genómica e calculou-se os seguintes parâmetros: percentagem de GC (guanina-citocina), a temperatura de *melting* (TM) e complementaridade da sequência do par. Idealmente a percentagem de GC deve ser entre 40-60% para existir uma distribuição uniforme das bases de citocina e guanina. A temperatura de *melting* deve ser entre 50-70°C. Por fim é importante verificar a complementaridade da sequência para não correr o risco de se formar estruturas secundárias. As soluções stock dos *primers* foram ressuspensos com água para perfazerem uma concentração final de 100 µM. Preparou-se soluções diluídas de cada *primer* na concentração final de 10 µM. Todas as soluções de *primers* foram guardadas a -20°C.

Na técnica de PCR, os *primers forward* e *reverse* hibridam em locais específicos da sequência do DNA alvo e o fragmento entre os locais de ligação do *primer* é amplificado. Neste estudo, na amplificação por PCR, os *primers* desenhados amplificam o comprimento total dos genes com os exões e intrões. Na amplificação dos transcritos por RT-PCR (reação em cadeia de polimerase com transcrição reversa quantitativa) (seção 4.2.6.), os *primers* amplificam as regiões codificantes, ou seja, só os fragmentos dos exões. As sequências de *primers* utilizadas, as condições de TM e percentagem de GC para cada sequência genómica estão indicadas no **Anexo A**.

4.2.4. Amplificação por PCR

O PCR é uma técnica amplamente utilizada em biologia molecular que permite amplificar muitas cópias de uma sequência específica de DNA para uso em diversos processos posteriores, como por exemplo, na sequenciação ou quantificação qualitativa

por eletroforese em gel de agarose. Esta técnica permitiu o desenvolvimento de um conjunto de novas tecnologias para o uso em diferentes aplicações como a expressão génica, a clonagem, a sequenciação, entre outras. Os reagentes para este processo bioquímico são a sequencia de DNA do organismo de interesse, os *primers* específicos do fragmento que se pretende amplificar (sempre em par *forward* e *reverse*), a Taq DNA polimerase porque é uma enzima termoestável e é específica para a amplificação dos fragmentos de DNA, nucleótidos livres e MgCl₂ (cloreto de magnésio) que funciona como cofator para a polimerase permitindo a incorporação dos nucleótidos durante a polimerização.

O termociclador (modelo *T100 Thermal Cycler, Biometra*) é o equipamento utilizado para amplificar o DNA e que automatiza os ciclos de temperatura. O programa de reação de PCR tem diferentes etapas: i) a etapa de desnaturação inicial realiza-se a altas temperaturas (>94°C) onde ocorre a separação das duas cadeias do DNA (ocorre uma vez); ii) cada ciclo inicia-se com a etapa de desnaturação (>94°C), seguida pela etapa de *annealing*, onde os *primers*, (com uma temperatura específica) se ligam especificamente às regiões complementares nas cadeias de DNA e inicia-se a replicação; e finalizado na etapa de extensão (72°C) em que a Taq DNA polimerase e os nucleótidos livres amplificam as novas sequencias de DNA; iii) o PCR é finalizado pela etapa de extensão final (72°C). A otimização no processo de PCR é uma das etapas mais importantes e que condicionam o sucesso da amplificação do DNA.

Neste estudo, para realizar o PCR de cada gene preparou-se amostras para os seis genes com os reagentes necessários para a reação de amplificação ocorrer com as concentrações indicados na **Tabela 1**. O controlo negativo é realizado para verificar que não ocorreu nenhuma contaminação durante a experiência.

Tabela 1: Volumes e concentrações finais otimizadas e utilizadas para cada solução no PCR.

	Controlo negativo	Amostras	Concentração final
<i>Primers forward e reverse</i> (10 µM)	1 µL + 1 µL	1 µL + 1 µL	0,4 µM
DNA NMP (32,1 ng µL ⁻¹)	-	2,5 µL	3,21 ng µL ⁻¹
<i>Supreme NZYTaQ II 2x Green Master Mix</i> (0,2 U µL ⁻¹)	12,5 µL	12,5 µL	0,1 U µL ⁻¹
H ₂ O destilada esterilizada	10,5 µL	8 µL	
Volume final	25 µL	25 µL	

O programa de reação foi realizado com as seguintes condições: desnaturação inicial por 3 minutos a 95°C, desnaturação por 30 segundos a 94°C, *annealing* por 30 segundos, extensão por 30 segundos por 72°C (repetido para 34 ciclos) e extensão final por 5 minutos a 72°C. A temperatura de *annealing* foi otimizada individualmente para

cada gene. Os genes BUX_00351_434, BUX_00422_33 e BUX_01281_82 amplificam à temperatura de 48°C e os genes BUX_00713_957, BUX_00422_152 e BUX_00397_6 amplificam à temperatura 50°C. Esta temperatura é estimada a partir da temperatura de *melting* indicada no **Anexo A**.

4.2.5. Validação dos resultados por eletroforese em gel de agarose

Neste estudo é utilizada a eletroforese horizontal com o objetivo de separar o DNA. Um campo elétrico é aplicado numa tina com um gel de agarose onde os ácidos nucleicos migram do elétrodo negativo para o elétrodo positivo e são separadas pelo seu tamanho relativo, carga e estrutura. Para visualizar e analisar os resultados do PCR preparou-se um gel de agarose a 1%. A agarose é dissolvida em tampão TBE0,5X (Tris/Ácido Bórico/EDTA) e aquecido até ficar homogêneo. O agente intercalante do DNA *Green safe* (NZYTech) homogeneizou-se em solução ainda líquida. O gel solidifica no berço de eletroforese como indicado na **Figura 13A**. Quando o gel de agarose solidificou colocou-se na tina de eletroforese. Adicionou-se 4 µL do marcador de DNA, 1kb DNA *Ladder ready-to-use* (BIORON), no primeiro poço e nos restantes poços adicionou-se 5/6 µL de cada amostra. Foi aplicada corrente elétrica na tina de eletroforese como demonstrado na **Figura 13B**, com uma intensidade de 80V durante 40min. Após terminar a corrida, observou-se o gel num transiluminador com radiação UV (VWR com sistema de fotodocumentação da marca, modelo *GenoView*) com sistema de fotodocumentação de imagens, indicado na **Figura 13C**.

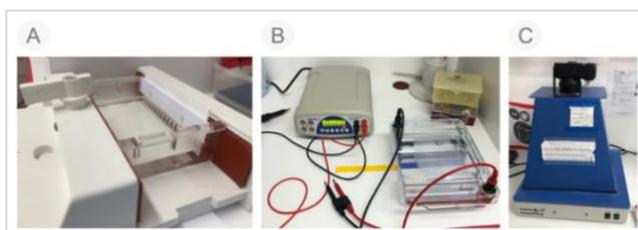


Figura 13: Preparação da eletroforese em gel de agarose. Berço com o gel de agarose a solidificar na imagem A. Na imagem B observa-se a tina de eletroforese ligada ao gerador de corrente elétrica. Na imagem C observa-se o transiluminador com radiação UV utilizado para documentar os resultados.

4.2.6. Síntese da cadeia simples de cDNA, amplificação dos transcritos por RT-PCR e validação por eletroforese em gel de agarose

Para validar os transcritos sintetizou-se a cadeia simples do cDNA (DNA complementar) utilizando o *kit SuperScript® III First-Strand* (Thermo Fisher Scientific). O cDNA foi sintetizado a partir de uma amostra de RNA do NMP com uma concentração

de 697,6 ng/μL para se obter uma amostra de cDNA com uma concentração final de aproximadamente 1000 ng. As reações foram realizadas de acordo a bula do fabricante. Guardou-se o cDNA a -20°C. Para amplificar os transcritos realizou-se um RT-PCR a partir do cDNA. Os *primers forward e reverse* utilizados para a amplificação estão indicados no **Anexo A**. Adicionou-se os volumes indicados na **Tabela 2** de cada solução com as seguintes concentrações em tubos de 0,2mL. Foi realizado um controlo negativo de modo a verificar que não existiu nenhuma contaminação durante a experiência.

Tabela 2: Amplificação dos transcritos a partir do cDNA por RT-PCR com a utilização dos seguintes volumes otimizados e as respetivas concentrações finais.

	Controlo negativo	Amostras	Concentração final
<i>Primers forward e reverse</i> (10 μM)	1 μL + 1 μL	1 μL + 1 μL	0,8 μM
cDNA (1000 ng)	-	2 μL	160 ng
<i>Supreme NZYTaQ II 2x Green Master Mix</i> (0,2 U μL ⁻¹)	6,25 μL	6,25 μL	0,1 U μL ⁻¹
H ₂ O destilada esterilizada	4,25 μL	2,25 μL	
Volume final	12,5 μL	12,5 μL	

O programa de reação foi realizado com as mesmas condições de temperatura utilizadas na seção 4.2.4. Para verificar os resultados do RT-PCR realizou-se uma eletroforese em gel de agarose a 1,4% preparada como descrito anteriormente na seção 4.2.5. Observou-se o gel num transiluminador com radiação UV com sistema de fotodocumentação.

4.2.7. Purificação dos produtos PCR e sequenciação direta pelo método de Sanger

Para a validação das sequencias de cada gene amplificado pelo PCR, seção 4.2.4., purificou-se as amostras e sequenciou-se pelo método de Sanger. Os produtos de PCR que correspondem ao comprimento total dos genes amplificados foram purificados pelo kit MinElute PCR *Purification* (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. Os produtos de PCR purificados foram eluídos em 15 μL de buffer de eluição por centrifugação a 13000 rpm durante 1 minuto.

Os produtos de PCR purificados para cada gene, exceto dos genes BUX_00351_434 e BUX_01281_82, foram enviados para a sequenciação direta dos fragmentos pelo método de Sanger (enviados para a empresa STABvida, Portugal). As sequencias foram analisadas utilizando os programas *4peaks* (<https://nucleobytes.com/4peaks/>), *Clustal* e *Omega*

(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) e o *CLC Sequence Viewer 8* (Qiagen), para a edição e alinhamento das sequências.

4.3. Validação da expressão dos genes nos tecidos dos nemátodes por hibridação *in situ*

A hibridização *in situ* é uma técnica com grande sensibilidade normalmente utilizada para detetar e localizar sequências de DNA ou RNA numa amostra biológica. Neste trabalho, este método será utilizado para caracterizar e identificar a localização da expressão dos genes em estudo nos tecidos do nemátode, através do protocolo descrito no estudo de Boer *et al.*, 1998.

4.3.1. Desenho dos *primers* e amplificação dos fragmentos por RT-PCR

Para cada gene candidato, os *primers forward* e *reverse* foram desenhados no *Primer 3 Input* (<https://primer3.ut.ee/>; Untergasser *et al.*, 2012), na sequência do transcrito. No máximo, cada par de *primers* deve gerar um fragmento de 200 nucleóticos, suficientemente sensível e também específico. As condições de TM e percentagem de GC para cada sequência estão indicadas no **Anexo B**. Para amplificar o fragmento de cada gene por RT-PCR, adicionou-se os volumes de cada solução indicados na **Tabela 3** com as seguintes concentrações.

Tabela 3: Volumes e concentrações finais dos reagentes utilizados para realizar o RT-PCR para amplificar os fragmentos para a hibridação *in situ*.

	Controlo negativo	Amostras	Concentração final
<i>Primers Forward e Reverse</i> (10 µM)	5 µL + 5 µL	5 µL + 5 µL	1 µM
<i>dNTP mixture</i> (2mM)	5 µL	5 µL	0,2 mM
MgCl ₂ (50 mM)	2 µL	2 µL	2 mM
<i>Platinum Taq High Fidelity</i> (5 U µL ⁻¹)	0,2 µL	0,2 µL	0,02 U µL ⁻¹
cDNA (1000 ng)	-	2 µL	40 ng
<i>10X High Fidelity PCR buffer</i>	5 µL	5 µL	
H ₂ O destilada esterilizada	25,8	25,8	
Volume final	50 µL	50 µL	

A reação foi realizada de acordo com o descrito na seção 4.2.4. e a temperatura de *annealing* utilizada foi de 48°C. Os produtos de RT-PCR foram purificados pelo *kit MinElute PCR Purification* (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. Esta purificação foi realizada seguindo as mesmas indicações da seção 4.2.7. Para confirmar que a amplificação dos produtos purificados, realizou-se uma eletroforese em gel de

agarose a 2% preparada como descrito anteriormente na seção 4.2.5. utilizando o marcador *NZYDNA Ladder V*. Os resultados obtidos foram visualizados no transiluminador com radiação UV com sistema de fotodocumentação.

4.3.2. Síntese das sondas com a Digoxigenina

Todos os produtos RT-PCR purificados foram quantificados no *Qubit 4 Fluorometer* com o objetivo de se conhecer a concentração (como descrito na seção 4.2.2.). Para sintetizar sondas com a digoxigenina (*DIG DNA Labeling Mix, Roche*), utilizou-se o produto purificado com uma concentração igual ou superior a 50 ng. Para cada gene sintetizou-se uma sonda *antisense* com o *primer reverse* e uma sonda *sense* com o *primer forward*. Como controlo para este estudo utilizou-se o gene *BUX_00119_44*, endoglucanase expressa nas glândulas esofágicas, para o qual se sintetizou só uma sonda *antisense*. Para cada gene as reações foram feitas de acordo com a indicação do **Anexo C**. A reação de PCR decorreu com 35 ciclos nas seguintes condições: desnaturação inicial por 2 minutos a 95°C, desnaturação por 15 segundos a 95°C, *annealing* por 30 segundos a 48°C, extensão por 90 segundos por 72°C e extensão final por 5 minutos a 72°C. Para verificar os resultados de PCR realizou-se uma eletroforese em gel de agarose a 1,4% preparada como descrito anteriormente na seção 4.2.5. utilizando o marcador *NZYDNA Ladder V*. Após terminar a corrida, observou-se o gel no transiluminador com radiação UV com sistema de fotodocumentação.

4.3.3. Fixação e corte dos NMP

Os NMP (provenientes do isolado BxRefINIAV) foram concentrados num tubo de 15 mL, ao qual se adicionou 4 mL de paraformaldeído a 2%. Fixou-se os nemátodes a 4°C por 18 horas e por 4 horas à temperatura ambiente. Os nemátodes fixados foram concentrados 2 minutos a 8000 rpm e ressuspensos em 200 µL de 10X paraformaldeído diluído para limitar a sua exposição. Os nemátodes foram cortados com uma lâmina e uma bomba vibratória como ilustrado na **Figura 14A**. O corte dos nemátodes é um passo importante para a hibridação das sondas nos tecidos, e por isso, foi-se verificando o corte à lupa para garantir que os nemátodes ficam cortados. Os nemátodes fixados foram concentrados em dois tubos de 1,5 mL como ilustrado na **Figura 14B**.

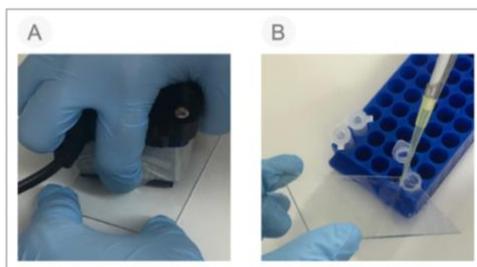


Figura 14: A) Corte dos NMP com uma lâmina e uma bomba vibratória. B) Coleta dos nemátodes cortados para um tubo de 1,5 mL com o auxílio de uma ponta de uma pipeta com paraformaldeído diluído.

4.3.4. Permeabilização, hibridação e visualização das sondas nos tecidos do NMP

Para permeabilizar os tecidos dos nemátodes cortados, preparou-se uma solução de Proteinase K com 1 mL de tampão *M9* (26,4 μ L de proteinase-K stock, *Roche*) e adicionou-se 500 μ L da solução de Proteinase K aos nematodes. Incubou-se por 30 a 35 minutos à temperatura ambiente num aparelho de rotação. Centrifugou-se a 1000 rpm por 2 minutos e lavou-se o precipitado com 1 mL de tampão *M9* e congelou-se o precipitado de nemátodes a -20°C por 15 minutos. Os nemátodes foram lavados com metanol frio (-20°C) e acetona fria (-20°C). Reidratou-se o precipitado dos nemátodes adicionando gotas de água destilada esterilizada.

Suspendeu-se os nemátodes em tampão de hibridação e homogeneizou-se por 15 minutos a 50°C . As sondas de digoxigenina (DIG) preparadas previamente foram incubadas a 95°C para desnaturarem por 10 minutos e de seguida colocadas diretamente no gelo. Para cada sonda, foi preparado em tubos de 0,5 mL, previamente etiquetados, 20 μ L da respetiva sonda DIG e 150 μ L da suspensão de nemátodes em tampão de hibridação. Incubou durante a noite a 50°C com rotação.

Após 16 horas, os nemátodes foram passados por sucessivas lavagens com diferentes reagentes: 4xSSC (citrato salino-sódio) e 0,1xSSC/0,1%SDS (dodecil sulfato de sódio). Em todas as lavagens centrifugou-se por 2 minutos a 10000 rpm e descartou-se o sobrenadante. Repetiu-se o processo as vezes necessárias de acordo com o protocolo.

Incubou-se os nemátodes por 30 minutos em 1X *blocking reagent* (*Roche*) na estufa a 27°C com rotação. Adicionou-se o tampão de deteção de fosfatase alcalina com o anticorpo Fab-anti-digoxigenina conjugado (*Roche*) e incubou-se a 27°C com rotação. Após 2 horas, lavou-se com tampão de lavagem 1X DIG (*Roche*) por 15 minutos. Os nematodes foram incubados em 1X tampão de deteção de fosfatase alcalina (*Roche*), e a solução de deteção NBT/BCIP (*Roche*). Foi possível observar que ficaram de

imediate com uma cor amarelada como ilustrado na **Figura 15A**. Os tubos foram colocados na horizontal durante 16 horas à temperatura ambiente e sem agitação como é visualizado na **Figura 15B e C**.



Figura 15: A) Tubo eppendorf com coloração amarelada depois da adição da solução NBT/BCIP stock. B) e C) Local horizontal onde se colocou os tubos durante a noite.

No dia seguinte as soluções dos tubos apresentavam uma cor roxeada como é possível observar-se na **Figura 16A**. Centrifugou-se e adicionou-se *Tween*0,1% à solução. Fez-se uma preparação temporária para cada sonda com lâmina e lamela, como observado na **Figura 16B e C**. As preparações foram visualizadas ao microscópio ótico (OLYMPUS BX50) com uma camera fotográfica acoplada (DP70), como indicado na Error! Reference source not found.D, e no software Cell D para fotodocumentar os resultados obtidos.

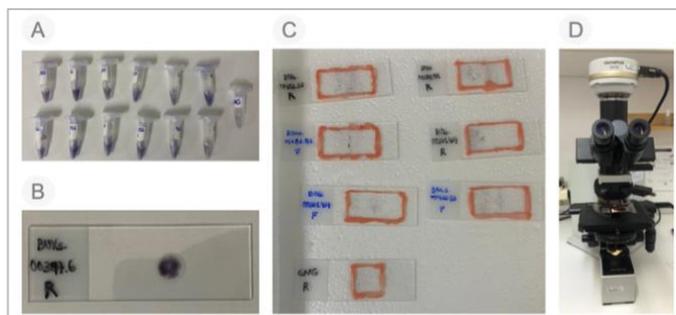


Figura 16: A) Tubos eppendorfs com as sondas sense e antisense hibridizadas com cor roxa. B) e C) Preparação temporária com os nemátodes. D) Microscópio utilizado para visualizar os resultados.

4.4. Diagrama do trabalho experimental

O seguinte esquema apresentado na **Figura 17** ilustra todos os pontos realizados na metodologia experimental.

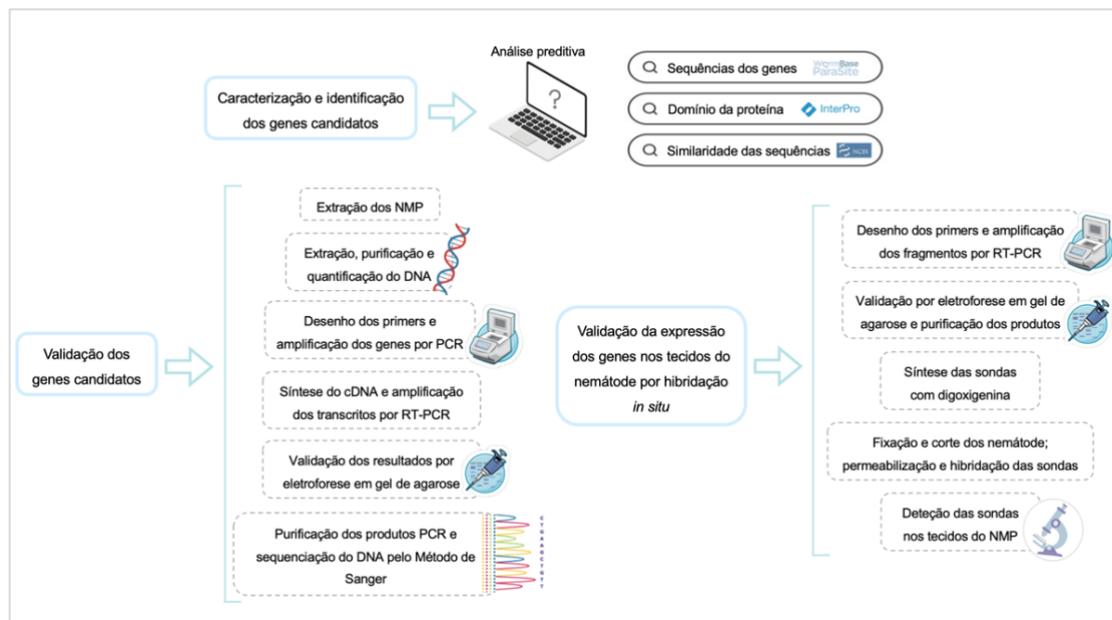


Figura 17: Esquema ilustrativo da metodologia experimental do estudo.

5. Resultados experimentais e discussão

5.1 Caracterização e identificação dos genes candidatos para estudos

Com base nas diferentes ferramentas disponíveis *online* referidas na seção 4.1 da metodologia experimental, descreveu-se e caracterizou-se os genes em estudo segundo o seu tamanho, domínio proteico, possível função e sinal peptídico. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 4**. Analisando o sinal peptídico obtido tanto no *InterPro* como no *SignalP-6.0*, demonstrado no **Anexo D** é possível verificar que todas as proteínas têm a presença de sinal peptídico, o que pode significar que são secretadas para fora das células onde são produzidas no parasita. Nos nemátodes fitoparasitas, a presença de sinal peptídico pode indicar que estas proteínas serão secretadas i) via estilete se forem expressas nas glândulas esofágicas ou ii) para dentro do nemátode se forem expressas noutros tecidos desempenhando uma função importante (por exemplo no intestino).

Tabela 4: Caracterização dos genes candidatos em estudo utilizando modelos preditivos (análise *in silico*).

Identificação do gene	Tamanho do gene (bp)	Tamanho do cDNA (bp)	Tamanho da proteína (aa)	Domínio da proteína (<i>InterPro</i>)	Sinal peptídico
BUX_00351_434	2187	1644	333	Não conhecido	Sim, entre o aminoácido 15 e 16
BUX_00713_957	1804	1092	363	Protease A1 (IPR033121)	Sim, entre o aminoácido 17 e 18
BUX_00422_33	638	519	172	Não conhecido	Sim, entre o aminoácido 18 e 19
BUX_00422_152	1732	1539	512	Glicosil hidrolase família GH13 (IPR006047) Alfa amílase (IPR031319)	Sim, entre o aminoácido 17 e 18
BUX_00397_6	1386	699	232	Glicosil hidrolase família GH45 (IPR000334)	Sim, entre o aminoácido 18 e 19
BUX_01281_82	1388	1089	362	Protease A1 (IPR033121)	Sim, entre o aminoácido 19 e 20

O tamanho das sequências genômicas variam entre 638 bp e 2187 bp. É possível observar-se que o gene BUX_00351_434 tem a maior sequência genômica esperada e o gene BUX_00422_33 tem a menor sequência genômica esperada. Com o programa *Exon-Intron Graphic Maker*, desenhou-se um esquema ilustrativo para cada gene com o tamanho dos seus exões e intrões indicado na **Figura 18**. Na **Tabela 4**, o tamanho da sequência de cada transcrito varia entre 172 bp e os 512 bp. A sequência tem um menor tamanho que o a sequência genômica respectiva porque o fragmento codificante de cada gene é formado só pelos exões da cadeia de nucleóticos inicial. As proteínas funcionais que são codificadas a partir dos seis genes têm tamanhos esperados entre 172 aminoácidos e 512 aminoácidos.

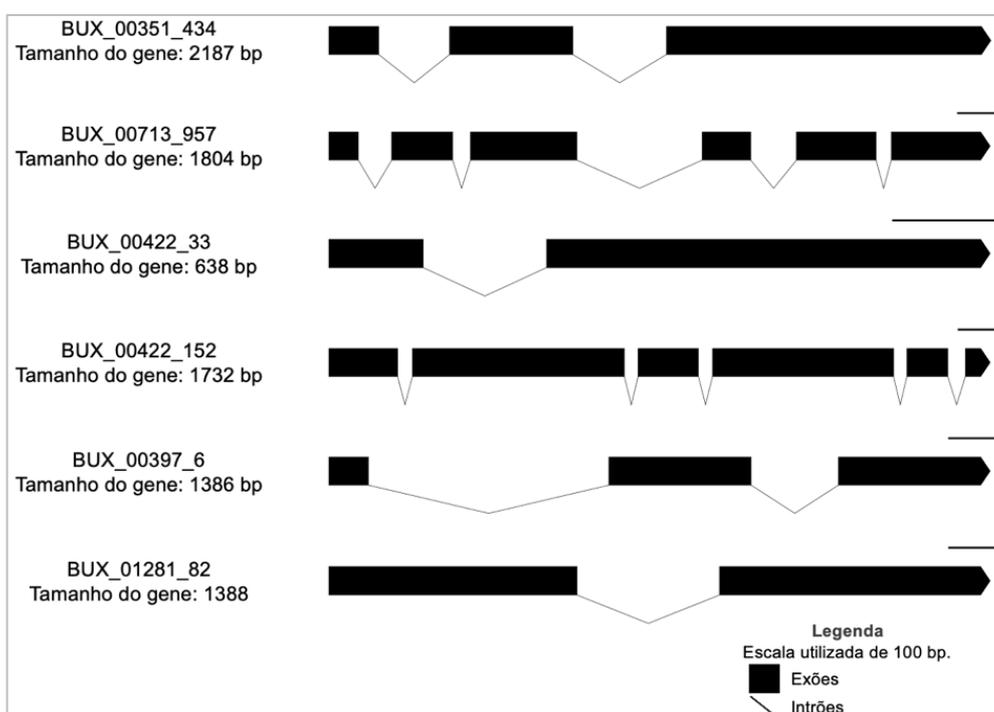


Figura 18: Esquema ilustrativo do tamanho esperado dos intrões e exões nas sequências genômicas em estudo.

É importante conhecer o domínio e a função de cada proteína para a caracterizar. Utilizando o *InterPro* e analisando os resultados obtidos indicados na **Tabela 4** e no **Anexo E** é possível tirar as seguintes conclusões. Para as proteínas codificadas pelos genes BUX_00351_434 e BUX_00422_33, não foi possível encontrar similaridade na base de dados com nenhum domínio já conhecido, o que pode indicar que as proteínas são específicas do NMP. Do ponto de vista do parasitismo, poderão ser proteínas únicas utilizadas por este nemátode na interação com o seu hospedeiro. As proteínas BUX_00713_957 e BUX_01281_82 são proteases aspárticas A1. As enzimas desta família são predominantemente encontradas em eucariotas e clivam as ligações

peptídicas entre os aminoácidos das proteínas. Desempenham vários papéis nos processos biológicos e estão envolvidas na alimentação dos conteúdos celulares e na defesa do nemátode (Kikuchi *et al.*, 2011, Shinya *et al.*, 2021). Num estudo, Castagnone-Sereno *et al.*, 2011, foi descrito que as proteases são expressas em diferentes organismos parasitas nomeadamente no nemátode das galhas, *Meloidogyne incognita*, onde são secretadas dentro do hospedeiro e desempenham um papel importante no sucesso do parasitismo.

A pesquisa preditiva indica que a proteína BUX_00422_152 pode ter vários domínios proteicos: do aminoácido 30 ao 417 desempenha a função de uma glicosil hidrolase 13 e do aminoácido 426 ao 511 desempenha a função de uma alfa amílase. A proteína alfa amílase pertence à família das glicosil hidrolase família GH13. Um estudo anterior, Chen *et al.*, 2020, caracterizou três genes que codificam alfa-amílase e são expressos no endoparasita migratório *Ditylenchus destructor*. Os autores mostraram que a presença desta proteína secretada tem implicações diretas no sucesso do parasita e possivelmente estará envolvida na absorção nutricional dos glúcidos presentes na batata (hospedeiro).

O domínio funcional da proteína BUX_00397_6 é glicosil hidrolase família GH45. Esta família caracteriza-se pelo domínio das celulasas ou endoglucanases. Todos os nemátodes fitoparasitas têm diferentes celulasas para degradar a parede celular das células vegetais (Haegeman *et al.*, 2012). Estas proteínas em particular (GH45) são expressas nas espécies de nemátodes *Bursaphelenchus sp.* e *Aphelenchoides besseyi* e que estão envolvidas na degradação da parede celular do hospedeiro durante a infeção (Kikuchi *et al.*, 2004; Kikuchi *et al.*, 2011).

Para analisar a similaridade das sequencias proteicas deste estudo com outros organismos, realizou-se um *BLASTP* com todos as espécies nemátodes e com outros organismos. Na **Tabela 5** está representado o organismo com a sequencia proteica mais similar à proteína respetiva do NMP. Pelos resultados obtidos do estudo preditivo da similaridade da sequencia proteica feita no *Wormbase parasite*, a percentagem de identidade varia entre os 81,3% e os 32,7% (*e-value* entre 1,3E-133 e 4,2E-08). Para os genes BUX_00351_434, BUX_00713_957 e BUX_01281_82 a percentagem de similaridade com a proteína dos nemátodes *Meloidogyne arenaria* e *Bursaphelenchus okinawaensis*, respetivamente, é inferior a 50% o que significa que são proteínas muito diferentes do nemátode em análise. Estas proteínas podem ser únicas no NMP.

Tabela 5: Similaridade das sequências proteicas em estudo com todos os nemátodes estudados e conhecidos atualmente realizado no Wormbase Parasite.

Identificação do gene	Organismo	Descrição	% de identidade	E-value
BUX_00351_434	<i>Meloidogyne arenaria</i>	Nemátode fitoparásita de galhas	33	1,90E-10
BUX_00713_957	<i>Bursaphelenchus okinawaensis</i>	Nemátode que se alimenta de fungos e é utilizado como modelo de laboratório para estudar o gênero <i>Bursaphelenchus</i>	32,7	5,00E-28
BUX_00422_33	<i>Bursaphelenchus okinawaensis</i>		78,8	1,20E-09
BUX_00422_152	<i>Halicephalobus mephisto</i>	Nemátode de vida livre que se alimenta de bactérias	76,0	5,80E-06
BUX_00397_6	<i>Bursaphelenchus okinawaensis</i>	Nemátode que se alimenta de fungos e é utilizado como modelo de laboratório para estudar o gênero <i>Bursaphelenchus</i>	81,3	1,30E-113
BUX_01281_82	<i>Bursaphelenchus okinawaensis</i>		31,1	4,20E-08

Os genes BUX_00422_33 e BUX_00397_6 tem uma percentagem de similaridade com proteínas do nemátode *Bursaphelenchus okinawaensis* muito significativa, superior a 78% (*e-value* 1,20E-09, 1,30E-113). A sequência proteica do gene BUX_00422_33 tem 78,8% de similaridade com a sequência proteica do gene BOKI_030122800. O domínio funcional para esta duas proteínas é desconhecido, no entanto parece ser específico do gênero *Bursaphelenchus*. A sequência proteica do gene BUX_00397_6 tem 81,3% de identidade com a sequência proteica do gene BOKI_050065400. Com uma análise desta sequência no *InterPro*, é possível concluir que estes dois genes tem o mesmo domínio proteico, Glicosil hidrolase família GH45, e possivelmente desempenham a mesma função, mas em organismos diferentes. Um destes organismos é micófito e outro é fitoparásita, mas ambos do mesmo gênero *Bursaphelenchus*. Utilizam estas celulases para degradar a parede celular das células vegetais.

O gene BUX_00422_152 tem uma percentagem de similaridade muito significativa (76%; *e-value* 5,80E-06) com uma sequência proteica do nemátode de vida livre, *Halicephalobus mephisto*, que se alimenta de bactérias e é capaz de sobreviver a uma profundidade de 3,6 km a temperaturas até 37°C. Este gene tem uma percentagem de similaridade bastante significativa de 76% com o gene MSTRG_7137 e analisando no *InterPro*, é possível concluir que estes dois genes tem o mesmo domínio proteico, glicosil hidrolase família GH13 e por isso desempenham a mesma função.

Com o conhecimento de que algumas proteínas em estudo têm percentagens de similaridade elevadas com proteínas de outros nemátodes, é possível perceber se as proteínas que são expressas no NMP são específicas e/ou se podem estar presentes

noutros organismos. Através da base de dados do *site NCBI*, realizou-se este estudo e os resultados preditivos obtidos estão indicados na **Tabela 6**.

Tabela 6: Resultados obtidos para a similaridade das sequencias proteicas em estudo com todos os organismos publicados na base de dados do *NCBI*.

Identificação do gene	Organismo	Descrição	% de identidade	e-value
BUX_00351_434	<i>Gymnodraco acuticeps</i>	Espécie de peixe-dragão nativo do Oceano Antártico	32,65	3,00E-06
BUX_00713_957	<i>Pararhizobium haloflavum</i>	Bactéria	36,59	6,00E-47
BUX_00422_33	<i>Bursaphelenchus okinawaensis</i>	Nemátode que se alimenta de fungos e é utilizado como modelo de laboratório para estudar o gênero <i>Bursaphelenchus</i>	48,37	5,00E-28
BUX_00422_152	<i>Halicephalobus mephisto</i>	Nemátode de vida livre que se alimenta de bactérias	76	5,80E-06
BUX_00397_6	<i>Bursaphelenchus okinawaensis</i>	Nemátode que se alimenta de fungos e é utilizado como modelo	77,48	7,00E-133
BUX_01281_82	<i>Bursaphelenchus okinawaensis</i>	de laboratório para estudar o gênero <i>Bursaphelenchus</i>	28,53	3,00E-28

O estudo preditivo da similaridade da sequencia proteica feita no *NCBI* revela que a percentagem de identidade varia entre os 77,48% e os 28,53% (*e-value* entre 7,0E-133 e 3,0E-06). O gene BUX_00351_434 tem uma percentagem de similaridade de sequencia proteica relativamente baixa com o organismo *Gymnodraco acuticeps* que é uma espécie de peixe-dragão nativo do Oceano Antártico. Esta proteína no peixe desempenha a função de protease aspártica A1, contudo, como a percentagem de similaridade com a proteína do NMP é muito baixa não se pode caracterizar esta proteína de domínio desconhecido como uma enzima pertencente esta família. O gene BUX_00713_957 tem uma percentagem de identidade de 33% com uma sequencia proteica do organismo *Pararhizobium haloflavum*. A proteína tem a função de uma protease A1 na bactéria o que coincide com a função proteica do NMP. Para os genes BUX_00422_33, BUX_00397_6 e BUX_01281_82 o organismo com maior similaridade com as sequencias proteicas é o *Bursaphelenchus okinawaensis*, pertencente ao mesmo género, o que pode indicar que esta proteína é especifica do *Bursaphelenchus*. Para o gene BUX_00422_152 o resultado obtido foi igual ao da **Tabela 5**. Para estes quatro genes, o organismo com a sequencia proteica com a maior similaridade obtida foi mesmo independente do leque de organismos que é utilizado para análise.

Após o estudo preditivo aprofundado de cada gene, é necessário validar os resultados obtidos experimentalmente por técnicas da biologia molecular e por hibridação *in situ*.

5.2 Validação dos genes candidatos

Após a extração e purificação do DNA genómico, quantificou-se as amostras no *Qubit 4 Fluorometer* obtendo-se uma concentração de $64,2 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. A partir deste DNA, fez-se uma solução trabalho com uma concentração de $32,1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ e preparou-se as amostras de PCR para cada gene. O resultado da amplificação no gel de agarose está ilustrado na **Figura 19**.

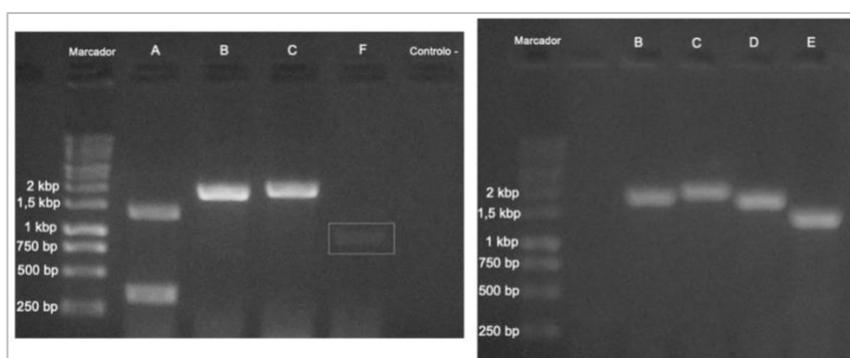


Figura 19: Resultados obtidos da validação por eletroforese em gel de agarose da amplificação dos seis genes em estudo. Legenda: BUX_00351_434 (A), BUX_00713_957 (B), BUX_00422_33 (C), BUX_00422_152 (D), BUX_00397_6 (E) e BUX_01281_82 (F). Marcador utilizado: 1 Kb DNA *Ladder ready-to-use* (BIORON).

Analisando qualitativamente os resultados obteve-se o tamanho esperado e previsto preditivamente dos genes BUX_00713_957 (B), BUX_00422_152 (D) e BUX_00397_6 (E). Não se registou nenhuma banda para o controlo negativo o que indica que não houve nenhuma contaminação na realização deste ensaio. No gene BUX_00351_434 (A) observa-se duas bandas fortes no gel o que possivelmente significa que a reação do PCR amplificou dois fragmentos da sequência genómica predita. O tamanho esperado seria de 2187 bp o que não corresponde a nenhuma das bandas obtidas. Para o gene BUX_00713_957 (B) e o gene BUX_00422_152 (D) o tamanho esperado e qualitativamente analisando pelo gel coincidem. No gene BUX_00422_33 (C) o tamanho esperado era de 638 bp e qualitativamente obteve um tamanho entre os 1500 bp e os 2000 bp. No gene BUX_00397_6 (E) o tamanho predito foi de 1386 bp e a banda no gel está entre os 1000 bp e os 1500bp. Por fim para o gene BUX_01281_82 (F) o tamanho esperado seria 1388 bp e observando o gel não se conseguiu amplificar o gene com uma concentração elevada e a respetiva banda encontra-se aproximadamente no

1000bp. Cinco dos seis genes amplificaram com uma concentração elevada o que significa que são altamente expressos no NMP. Com estes resultados pode-se validar a expressão dos genes em estudo no NMP.

Para confirmar que os transcritos utilizados para o estudo também são expressos no NMP, sintetizou-se cDNA e amplificou-se os transcritos por RT-PCR. Posteriormente, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose com os produtos do RT-PCR como demonstrado na **Figura 20**.

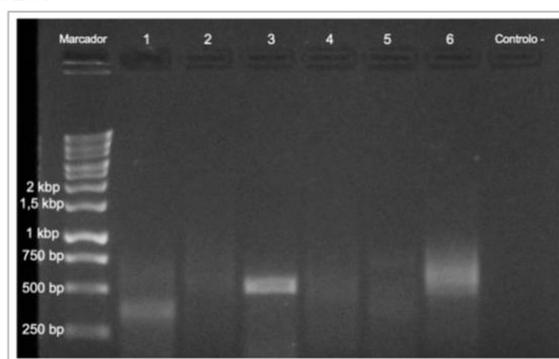


Figura 20: Resultados da amplificação dos transcritos dos genes candidatos por RT-PCR e visualização por eletroforese em gel de agarose. Os fragmentos de todos os genes foram validados e os tamanhos estão compreendidos entre 300bp e 700bp. Legenda: BUX_00351_434 (1), BUX_00713_957 (2), BUX_00422_33 (3), BUX_00422_152 (4), BUX_00397_6 (5) e BUX_01281_82 (6). Marcador utilizado: 1 Kb DNA Ladder ready-to-use (BIORON).

Foi possível validar a amplificação dos transcritos a partir do cDNA de cada gene com fragmentos compreendidos entre 300b e 700bp. Com recurso ao programa *CLC Sequence Viewer 8* foram analisados os resultados obtidos indicados no **Anexo F**. foi possível validar pela sequenciação direta pelo método de Sanger os genes BUX_00713_957, BUX_00422_152 e BUX_00397_6 através do alinhamento da sequencia predita (original) de cada gene com a sequencia nucleótidos amplificados experimentalmente. Apenas o gene BUX_00422_33 não foi possível validar-se porque a sequencia do gene difere da que se encontra anotada no genoma do NMP. Estas diferenças podem dever-se a erros de anotação dos genomas.

5.3 Localização da expressão dos genes nos tecidos dos nemátodes por hibridação *in situ*

Após a realização do RT-PCR para amplificar os fragmentos utilizados para sintetizar as sondas, purificou-se os produtos e fez-se uma eletroforese em gel de agarose onde se obteve o resultado apresentado na seguinte **Anexo G**. O tamanho para todos os fragmentos está compreendidos até 200 nucleótidos como era o expectável.

Com as concentrações conhecidas sintetizou-se as sondas DIG *sense* e *antisense* para cada gene em estudo e para o controlo positivo. A eletroforese em gel de agarose a 2% que foi realizada e está apresentada na **Figura 21**.

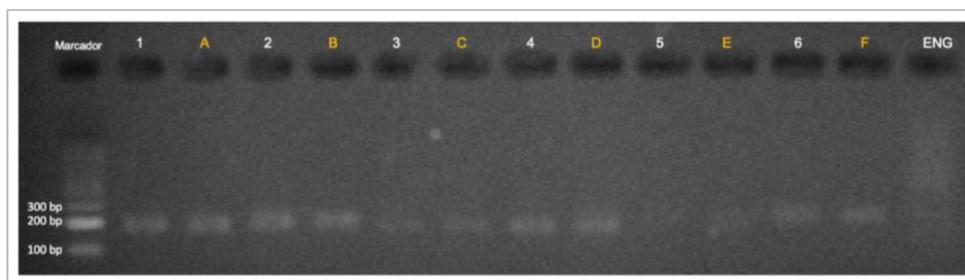


Figura 21: Resultado obtido para a validação das sondas *sense* e *antisense* incorporadas com a DIG por eletroforese em gel de agarose. As sondas *antisense* estão numeradas e as sondas *sense* estão indicadas por letras. Legenda: BUX_00351_434 (1 e A), BUX_00713_957 (2 e B), BUX_00422_33 (3 e C), BUX_00397_6 (4 e D), BUX_01281_82 (5 e E), BUX_01281_82 (6 e F) e BUX_00119_44 (ENG). Marcador utilizado: NZYDNA Ladder V.

A partir do tamanho das bandas do marcador é possível concluir que o tamanho dos fragmentos está entre os 100 bp e os 200 bp para todos os genes. Para o gene BUX_01281_82 (5 e E) as sondas *antisense* e *sense* não amplificaram a uma concentração muito significativa o que pode significar que este gene não é muito expresso. Para a sonda *antisense* do gene da endoglucanase (ENG) a amplificação também não foi muito significativa. Para os restantes genes as sondas amplificaram a uma concentração elevada. De seguida, realizou-se o procedimento da hibridação *in situ* onde no final se visualizou as preparações no microscópio e registou-se os resultados obtidos na **Figura 22**. Para os genes candidatos em estudo, todas as sondas *antisense* hibridaram no tecido do nemátode porque se observa uma coloração roxa mais intensa na zona do corte. Na imagem J, que corresponde a sonda *sense* do gene BUX_00397_6, observa-se que a técnica resultou, mas não existe a presença de sinal específico como era espectável na sonda *antisense*, indicada na Imagem F. No **Anexo H** está registado sondas *senses* para os seis genes.

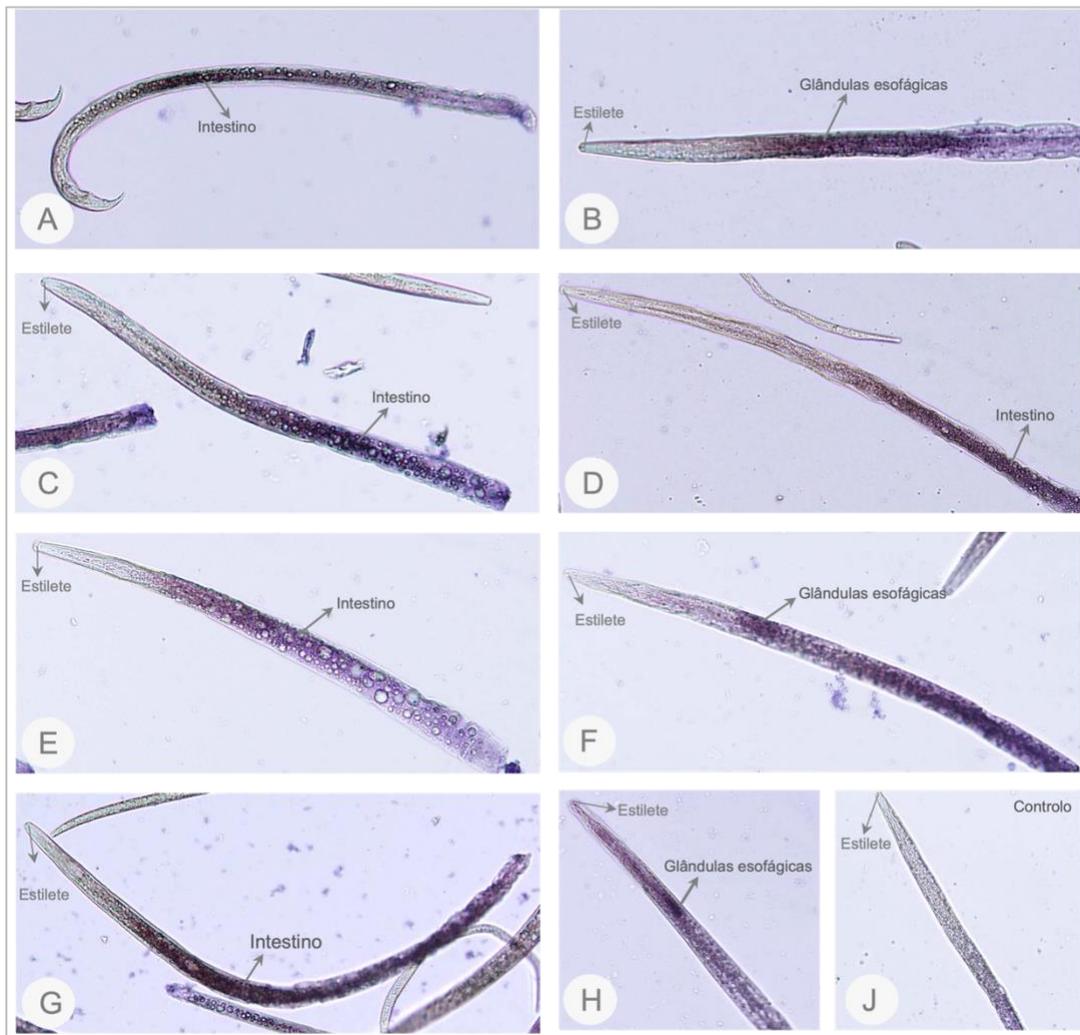


Figura 22: Imagens obtidas ao microscópio ótico *OLYMPUS BX50*, da técnica de hibridação *in situ* que tem como objetivo localizar os genes candidatos nos tecidos do nemátode. Legenda das sondas antisense: BUX_00351_434 (A e B), BUX_00713_957 (C); BUX_00422_33 (D); BUX_00422_152 (E); BUX_00397_6 (F); BUX_01281_82 (G) e BUX_00119_44 (H). Legenda das sondas sense: BUX_00397_6 (J). Ampliação das imagens A, B, C e G é de 100x e das imagens D, E, F, H e J é de 200x.

Para os genes BUX_00713_957 (Imagem C), BUX_00422_33 (Imagem D), BUX_00422_152 (Imagem E) e BUX_01281_82 (Imagem G) é possível visualizar um sinal de hibridação no intestino, na região posterior do nemátode. No gene BUX_00397_6 (imagem F) visualiza-se um sinal de hibridação nas glândulas esofágicas. Para o gene BUX_00119_44, controlo positivo, (imagem H) foi registado um sinal de hibridação nas glândulas esofágicas, como esperado, porque é nesse tecido que a endoglucanase é secretada para desempenhar a sua função.

No gene BUX_00351_434 visualiza-se um sinal de hibridação variável, tanto no intestino (imagem A) como nas glândulas esofágicas (imagem B), não sendo possível concluir em que tecido este gene é expresso. Com a análise da pesquisa preditiva, o domínio proteico para este gene não é conhecido e a percentagem de similaridade da

sequencia proteica com outras proteínas foi abaixo dos 70%, o que significa que esta proteína será específica do NMP. Seriam necessários mais estudos funcionais para perceber a função desde gene e o seu papel no parasitismo.

O gene BUX_00713_957 e o gene BUX_01281_82 (proteases A1) apresentam um sinal de hibridação forte no intestino (imagem B e G, respetivamente). Estas proteínas podem estar envolvidas na digestão dos conteúdos celulares do hospedeiro durante a infeção e migração do NMP. Em estudos anteriores, Espada *et al.*, 2016 e Kikuchi *et al.* 2011, verificou-se que o NMP expressa vários genes que desempenham a função de proteases A1 e que possivelmente são codificados no intestino. Noutros parasitas como *Meloidogyne incognita*, proteínas envolvidas na digestão dos conteúdos celulares, como proteases A1, também são expressas e desempenham uma função importante no parasitismo (Castagnone-Sereno *et al.*, 2011; Haegeman *et al.*, 2012).

Também o gene BUX_00422_33 foi localizado no intestino (imagem D), mas o seu domínio da proteína não é conhecido, poderá ter uma função semelhante aos anteriores. Neste caso, de acordo com o estudo preditivo, esta proteína está presente apenas no género *Bursaphelenchus* o que indica que poderá ser interessante estudá-la funcionalmente.

O gene BUX_00422_152 revela um sinal de hibridação no intestino (imagem E) e codifica uma proteína alfa amilase que está envolvida na absorção nutricional dos glúcidos. O domínio predito para a proteína está relacionado com o tecido onde é expressa, no intestino, o que possivelmente significa que terá uma função na alimentação do NMP do conteúdo celular do hospedeiro. No entanto, esta proteína não é específica deste nemátode sendo encontrada (com elevada similaridade) no organismo *Halicephalobus mephisto* que expressa uma proteína que desempenha a mesma função (seção 5.1.). A alfa amilase também pode ser encontrada no endoparasita migratório *Ditylenchus destructor* onde tem implicações diretas no sucesso do parasita porque está envolvida na absorção nutricional dos glúcidos (Chen *et al.*, 2020).

O gene BUX_00397_6 apresenta um sinal de hibridação nas glândulas esofágicas. Com os estudos anteriores preditivos, sabe-se que esta proteína apresenta um sinal peptídico e é uma enzima glicosil hidrolase família GH45 (celulase) que está envolvida na degradação da parede celular do hospedeiro. Os estudos publicados indicam que no NMP existem várias proteínas que desempenham esta função e são expressas nas glândulas esofágicas (Shinya *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013). Para além do NMP, estas proteínas são encontradas noutras espécies de nemátodes como *Meloidogyne*, *Aphelenchus*, *Heterodera* onde desempenham funções cruciais para o parasitismo

(Haegeman *et al.*, 2012). Pode concluir-se que o gene BUX_00397_6 em estudo desempenha uma função importante para o sucesso da migração e infecção do NMP.

6. Conclusões

Neste estudo caracterizou-se *in silico* e validou-se seis genes candidatos no genoma e transcriptoma do NMP potencialmente envolvidos no parasitismo. Analisou-se e compreendeu-se qual a sua potencial função na interação com o hospedeiro, com recurso a técnicas moleculares e de hibridação *in situ* com sondas de cDNA-DIG.

Durante a fase fitófaga, as interações entre o NMP e o hospedeiro são mediadas por proteínas de parasitismo que têm no N-terminal um sinal peptídico que sinaliza a sua secreção para o exterior do tecido onde são produzidas. Dos genes em estudo, dois codificam proteínas que têm domínio funcional desconhecido, representando assim proteínas únicas deste nemátode na interação com o seu hospedeiro. Por este motivo, podem ser de relevante importância no parasitismo e bons objetos de estudos futuros. Foi descrito uma proteína alfa amilase que é expressa no intestino do NMP e pensa-se estar envolvida na absorção nutricional. Mais estudos são necessários para compreender totalmente a sua função no parasitismo. Validou-se duas proteínas proteases A1 nos tecidos do intestino do NMP que possivelmente digerem os conteúdos celulares do hospedeiro e uma celulase que é expressa nas glândulas esofágicas, principal tecido envolvido no parasitismo do NMP, e degrada a parede celular das células para ajudar na migração do nemátode ao longo da planta.

Este trabalho validou e caracterizou seis proteínas envolvidas no parasitismo, contudo ainda é necessário mais estudos para compreender a função de todas as proteínas envolvidas na interação do parasita-hospedeiro e mais importante perceber como é que as proteínas únicas do NMP atuam e o tecido onde são expressas. Assim será possível encontrar-se soluções para o controlo deste fitoparasita.

7. Referências bibliográficas

Abelleira, A., Picoaga, A., Mansilla, J.P. and Aguin, O. (2011). Detection of *Bursaphelenchus xylophilus*, Causal Agent of Pine Wilt Disease on *Pinus pinaster* in Northwestern Spain. *Plant Disease*, 95, 776. DOI: <https://doi.org/10.1094/pdis-12-10-0902>.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).

Bulletin OEPP. (2013). PM 7/4 (3) *Bursaphelenchus xylophilus*. ISSN 0250-8052, 43, 105-118. DOI: <https://doi.org/10.1111/epp.12024>.

Cardoso, J.M.S., Anjo S.I., Manadas. B., Silva, H., Abrantes, I., Nakamura, K. and Fonseca, L. (2022). Virulence Biomarkers of *Bursaphelenchus xylophilus*: A Proteomic Approach. *Frontiers in Plant Science*. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.822289>.

Castagnone-Sereno, P., Deleury, E., Danchin, E.G.J., Perfus-Barbeoch, L. and Abad, P. (2011). Data-mining of the *Meloidogyne incognita* degradome and comparative analysis of proteases in nematodes. *Genomics*, 97, 29-36. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2010.10.002>.

Centro Pinus. (2022). A fileira do pinho em 2021 [PDF]. Retrieved from <https://www.centropinus.org/files/upload/indicadores/indicadores-2021-2022.pdf>.

Chen, L., Xu, M., Wang, C., Zheng, J., Huang, G., Chen, F., Peng, D., and Sun, M. (2020). Multi-copy alpha-amylase genes are crucial for *Ditylenchus destructor* to parasitize the plant host. *Public Library of Science One*, 15. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240805>.

De Boer, J.M., Yan, Y., Smant, G., Davis, E.L. and Baum, T.J. (1998). *In-situ* Hybridization to Messenger RNA in *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology*, 30, 309-312.

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

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

Espada, M., Silva, A.C., Evens-van den Akker, S., Maier, T., Paramasivan, V., Baum, T., Mota, M. and 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*. *BMS Genomics*, 19, 553. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4908-2>.

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

Eves van den Akker, S. (2021). Plant–nematode interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 62. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102035>.

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

Futai, K. (2013). Pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *The Annual Review of Phytopathology*, 51, 61-83. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-172910>.

Gu, J. (2018). Systematic Identification of the Xylophilus Group in the Genus *Bursaphelenchus*. In *Advances in plant pathology*. JS Kimatu (editor). DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.77096>.

Haegeman, A., Mantelin, S., Jones, J.T. and Gheysen, G. (2012). Functional roles of effectors of plant-parasitic nematodes. *Gene*, 492, 19-31. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.10.040>.

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

Hu, L-J., Wu, X-Q., Li, H-Y., Wang, Y-C. and Ye, J-R. (2019). An Effector, BxSapB1, Induces Cell Death and Contributes to Virulence in the Pine Wood Nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 32, 452-463. DOI: <https://doi.org/10.1094/mpmi-10-18-0275-r>.

Jones, J.T., Moens, M., Mota, M., Li, H. and Kikuchi, T. (2008). *Bursaphelenchus xylophilus*: opportunities in comparative genomics and molecular host–parasite interactions. *Molecular plant pathology*, 9, 357-368. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00461.x>.

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. and Perry, R.N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 14, 946-961. DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.12057>.

Kikuchi, T., Jones, J.T., Aikawaa, T., Kosakaa,H., and Oguraa, N. (2004). A family of glycosyl hydrolase family 45 cellulases from the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. Federation of European Biochemical Societies Letters, 572, 201–205. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.07.039>.

Kikuchi, T., Cotton, J.A., Dalzell, J.J., Hasegawa, K., Kanzaki, N., McVeigh, P., Takanashi, T., Tsai, I.J., Assefa, S.A., Cock, P.J.A., Otto, T.D., Hunt, M., Reid, A.J., Sanchez-Flores, A., Tsuchihara, K., Yokoi, T., Larsson, M.C., Miwa, J., Maule, A.G., Sahashi, N., Jones, J.T. and Berriman, M. (2011). Genomic insights into the origin of parasitism in the emerging plant pathogen *Bursaphelenchus xylophilus*. Public Library of Science Pathogens, 7. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002219>.

Mantelin, S., Bellafiore, S. and Kyndt, T. (2017). *Meloidogyne graminicola*: a major threat to rice agriculture. Molecular plant pathology, 18, 3-15. DOI: <https://doi.org/10.1111%2Fmpp.12394>.

Mathew, R. and Opperman, C.H. (2020). Current Insights into Migratory Endoparasitism: Deciphering the Biology, Parasitism Mechanisms, and Management Strategies of Key Migratory Endoparasitic Phytonematodes. Plant Parasitic Nematodes, 9, 671. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9060671>.

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

Nickle, W. R. (1970). A taxonomic review of the genera of the *Aphelenchoidea* (Fuchs, 1937) Thorne, 1949 (Nematoda: Tylenchida). Journal of Nematology, 2, 375–392.

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

Perry, R.N. and Moens, M. (2011). Introduction to plant-parasitic nematodes; modes of parasitism. Genomics and molecular of plant-nematode interactions, 3-20. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-007-0434-3_1.

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

Rodrigues, A.M., Carrasquinho, I. and António, C. (2021). Primary Metabolite Adjustments Associated With Pinewood Nematode Resistance in *Pinus pinaster*. *Frontiers in Plant Science*, 12. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.777681>.

Rodrigues, J.M., Sousa, E. and Abrantes, I. (2015). “Resenha histórica da doença da murchado do pinheiro.”. In *Doença da Murchidão do pinheiro na Europa - Interações biológicas e gestão integrada*. Portugal: FNAPF-Federação Nacional das Associações de Proprietários Florestais.

Shinya, R., Morisaka, H., Kikuchi, T., Takeuchi, Y., Ueda, M. and Futai, K. (2013). Secretome Analysis of the Pine Wood Nematode *Bursaphelenchus xylophilus* Reveals the Tangled Roots of Parasitism and Its Potential for Molecular Mimicry. *Public Library of Science One*, 8. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067377>.

Shinya, R., Kirino, H., Morisaka, H., Takeuchi-Kaneko, Y., Futai, K. and Ueda, M. (2021). Comparative Secretome and Functional Analyses Reveal Glycoside Hydrolase Family 30 and Cysteine Peptidase as Virulence Determinants in the Pinewood Nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Front in Plant Science*, 12, 640459. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.640459>.

Sousa, E., Bravo, M.A., Pires, J., Naves, P., Penas, A.C., Bonifácio, L. and Mota, M.M. (2001) *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda; *Aphelenchoididae*) associated with *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera; *Cerambycidae*) in Portugal. *Nematology* 3, 89–91. DOI: <http://dx.doi.org/10.1163/156854101300106937>.

Teufel, F., Almagro Armenteros, J.J., Johansen, A.R., Pihl, S.I., Tsirigos, D.K., Winther, O., Brunak, S., Heijne, G., Nielsen, H. (2022). SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. *Nature Biotechnology*, 40, 1023-1025. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01156-3>.

Tsai, I.J., Tanaka, R., Kanzaki, N., Akiba, M., Yokoi, T., Espada, M., Jones, J.T. and Kikuchi, T. (2016). Transcriptional and morphological changes in the transition from mycetophagous to phytophagous phase in the plant-parasitic nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Molecular plant pathology*, 17, 77-83. DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.12261>.

Southey, J.F. *Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes*. In Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. J. F. Southey.

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M. and Rozen, S.G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/nfr596>.

Vicente, C., Espada, M., Vieira, P. and Mota, M. (2012). Pine Wilt Disease: a threat to European forestry. *European Journal of Plant Pathology*, 133, 89-99. DOI: 10.1007/s10658-011-9924-x.

Vicente, C.S.L., Soares, M., Faria, J.M.S., Ramos, A.P. and Inácio, M.L. (2021). Insights into the Role of Fungi in Pine Wilt Disease. *Journal of Fungi*, 7, 780. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof7090780>.

Vicente, C. and Inácio, M.L. (2021). Estudo das interações nemátode - fungos na doença da murchidão do pinheiro - PineEnemy. *Agrociência*. Retrieved from https://www.inia.vpt/images/publicacoes/2021/Voz_do_campo_marco2021.pdf.

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

Zhao, Q., Hu, L.-J., Wu, X.-Q., and Wang, Y.-C. (2020). A key effector, BxSapB2, plays a role in the pathogenicity of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Forest Pathology*, 50. DOI: <https://doi.org/10.1111/efp.12600>.

Zhang, L., Fan, Y., Zheng, H., Du, F., Zhang, K., Huang, X., Wang, L., Zhang, M. and Niu, Q. (2013). Isolation and characterization of a novel endoglucanase from a *Bursaphelenchus xylophilus* metagenomic library. *Public Library of Science One*, 8. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082437>.

8. Anexos

Anexo A: Sequências de *primers* utilizadas neste estudo para amplificar o comprimento total dos genes candidatos (seção 4.2.4.) e os transcritos (seção 4.2.6). Valores de referência de temperatura de *melting* (TM) e percentagem de GC obtidos na pesquisa preditiva para cada *primer*.

Identificação dos genes	Sequência dos <i>primers</i> <i>Forward</i> (5' para 3'), <i>Reverse</i> (3' para 5')	TM (°C)	Percentagem de GC (<i>Forward</i> ; <i>Reverse</i>) %
BUX_00351_434	F →ATGCGACTATTCGTGTTGTTAC R →GACATATCTTGTCACCACTTTG	52,3	40,9; 40,9
BUX_00713_957	F →TTCTTCAGTTATAAACTCC R →CACTTTATAATGCTTATTTCAA	44,68	30,0; 22,7
BUX_00422_33	F →ATGAACTTGTATATTGCTGC R →CTAGCTGCTGAATTTGACTT	49,9	31,8; 40,0
BUX_00422_152	F →ATGAAGGGCATCGCTCTATT TTACAATCTGTTTGAGAGAGAA	51,4	45,0; 31,8
BUX_00397_6	F →ATGAAGCTTGTGGTAGCCTTGG R →TTAGGCGGTGAAGGAGTCGT	57,9	50,0; 55,0
BUX_01281_82	F →ATGGGTTTTGTCAGCTTCTA R →TTACTCAAAAAATTCTGTGGTG	50,5	40,0; 31,8

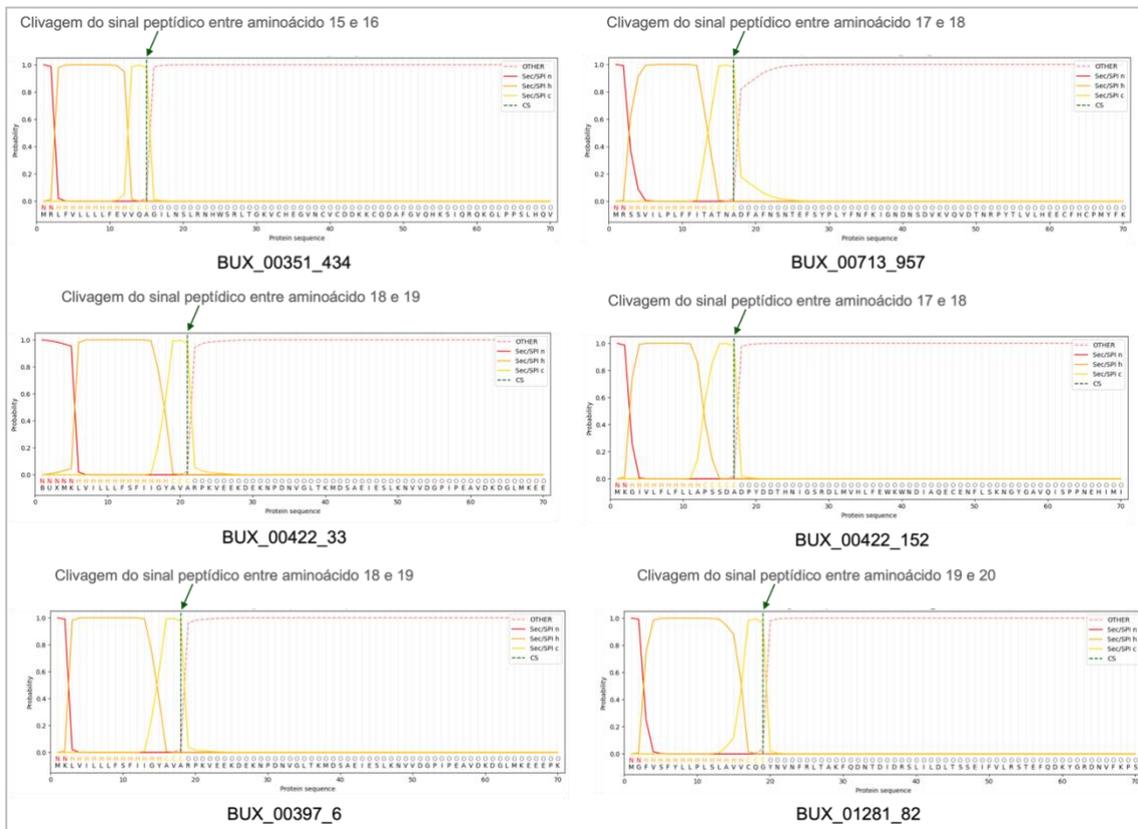
Anexo B: Valores de referência de temperatura de *melting* (TM) e percentagem de GC obtido pelo *software Primer 3 Web* para amplificar os fragmentos com as respectivas sequências de *primers*.

Identificação dos genes	Sequência dos <i>primers</i> para hibridação <i>in situ</i> <i>Forward</i> (5' para 3'), <i>Reverse</i> (3' para 5')	TM (°C)	Percentagem de GC (<i>Forward</i> ; <i>Reverse</i>) %
BUX_00351_434	F →GTTCCAGTCACGGTATTGCC R →GCACGAGTAAACCGAACACA	55,8	55,0; 50,0
BUX_00713_957	F →CGGAGCAGCAGATTGTCATC R →TCAACGGTTACATCAGCCCT	56,2	55,0; 50,0
BUX_00422_33	F →GGTCCCATTCTGAAGCTGT R →AATTCTTCCGATGGCATGGC	55,6	55,0; 50,0
BUX_00422_152	F →TGGCTCAAAGATCACAGCG R →TTGAAGTCTCCAAGCCGAT	56,3	55,0; 50,0
BUX_00397_6	F →CGGACAGGACCTCATATGCT R →TAAACTTCCCGGTGCAGACT	56,2	55,0; 50,0
BUX_01281_82	F →CCTGCGACATCAACGACAAG R →CATAGCAAGCACAGCACCAT	56,0	50,0; 50,0

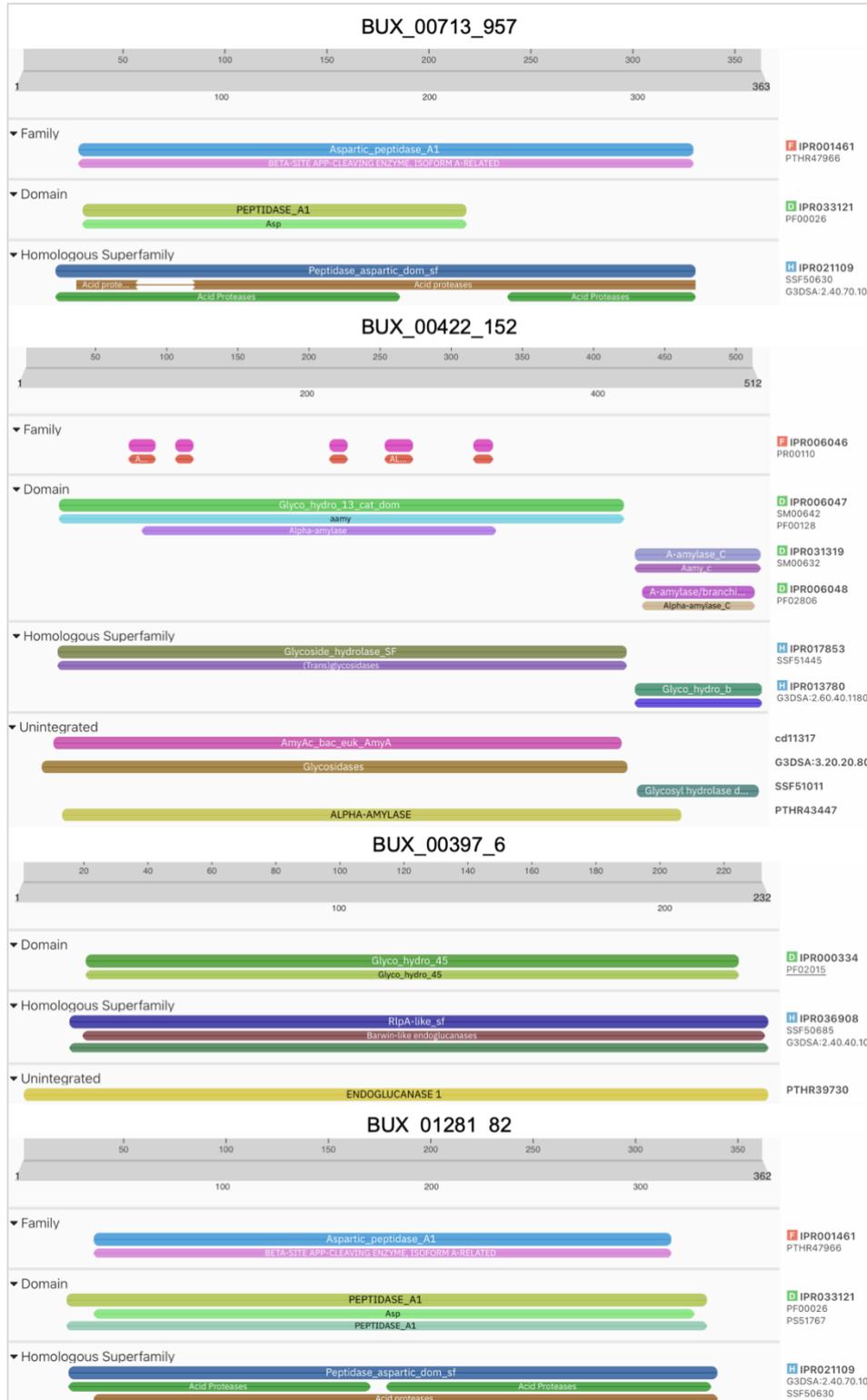
Anexo C: Volumes dos reagentes utilizados para sintetizar as sondas *sense* e *antisense* com a digoxigenina para todos os genes. Legenda: BUX_00351_434 (A), BUX_00713_957 (B); BUX_00422_33 (C); BUX_00422_152 (D); BUX_00397_6 (E); BUX_01281_82 (F) e BUX_00119_44 (ENG).

	Identificação dos genes						
	A	B	C	D	E	F	ENG
H ₂ O destilada esterilizada	4,7 µL	5,7 µL	3,7 µL	4,7 µL	1,7 µL	3,7 µL	8,7 µL
10X High Fidelity PCR buffer	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
MgCl ₂ (50 mM)	0,6 µL	0,6 µL	0,6 µL	0,6 µL	0,6 µL	0,6 µL	0,6 µL
DIG DNA Labeling Mix	1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL
Primer Forward ou Reverse	4 µL	4 µL	4 µL	4 µL	4 µL	4 µL	4 µL
Platinum Taq High Fidelity (5 U/µL)	0,2 µL	0,2 µL	0,2 µL	0,2 µL	0,2 µL	0,2 µL	0,2 µL
Produto RT-PCR purificado	7 µL	6 µL	8 µL	7 µL	10 µL	8 µL	3 µL

Anexo D: Resultados obtidos da análise preditiva do sinal peptídico de cada proteína pelo *SinalP- 6.0.0* local de clivagem do sinal peptídico está indicado na figura com uma seta para cada gene.



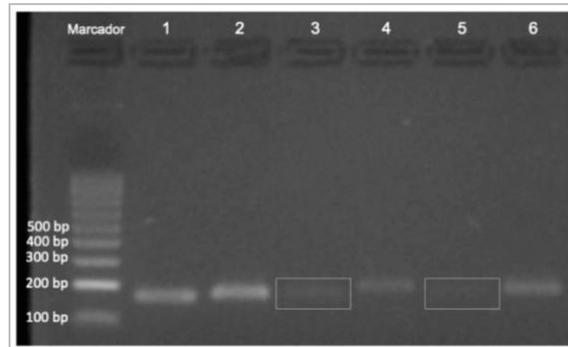
Anexo E: Resultados obtidos pela análise preditiva de cada gene no *InterPro* para identificar e classificar o domínio das proteínas que codificam. O gene BUX_00713_957 e o gene BUX_0181_82 codificam proteases A1. O gene BUX_00422_152 codifica uma proteína alfa amilase pertencente à família da glicosil hidrolase GH13. O gene BUX_00397_6 codifica uma proteína glicosil hidrolase da família GH45. Os domínios estão descritos na seção 5.1.



Anexo F: Alinhamento da sequencia preditiva e da sequencia amplificada experimentalmente dos genes BUX_00713_957, BUX_00422_152, BUX_01281_82 e BUX_00397_6 pelo programa CLC Sequence Viewer 8.

BUX_00713_957			BUX_00422_152		
Original Sequenciada	TTCTTCAGTTATAAATCCCAAAATGATGATACAAATGCAATGAATAAGATGCGTCTA -----TCTA	60 4	Original Sequenciada	GATGATACGCACAACTTGGCAGGAGGATTTGATGTCATCTTTTGAAGGAATGG -----GCACAACTTGGCAGGAGGATTTGATGTCATCTTTTGAAGGAATGG	120 52
Original Sequenciada	GCCTCATATTACCGCTTTTTCATCACTGGCAAAATGGCGACTTTGCTTCAATCTA GCCTCATATTACCGCTTTTTCATCACTGGCAAAATGGCGACTTTGCTTCAATCTA	120 64	Original Sequenciada	AATGACATTGCTCAAGAATGGAGAATTTCTTTCTAAAAGGATATGGTCGCTCAA AATGACATTGCTCAAGAATGGAGAATTTCTTTCTAAAAGGATATGGTCGCTCAA	180 112
Original Sequenciada	ACACAGTAAGTATACATCTTGTGTTTGAAGAGGCTTATTCATTGGCGAGTTTGT ACACAGTAAGTATACATCTTGTGTTTGAAGAGGCTTATTCATTGGCGAGTTTGT	180 124	Original Sequenciada	GTAGATTAAGAGTCTAAAACAACCTTTATTGTCAGATCTCCACCAATGACAT GTAGATTAAGAGTCTAAAACAACCTTTATTGTCAGATCTCCACCAATGACAT	240 172
Original Sequenciada	TACAAGCTTCAGAAAATATGTTTTTTCAGAAATCAGCTATCCACTATATTCAACT TACAAGCTTCAGAAAATATGTTTTTTCAGAAATCAGCTATCCACTATATTCAACT	240 184	Original Sequenciada	ATCATGATTAAGAAACACGATGCCCTGGTTGTAAGGATCAACCAATGACTAT ATCATGATTAAGAAACACGATGCCCTGGTTGTAAGGATCAACCAATGACTAT	300 232
Original Sequenciada	CAGATTTGTAAGCACAACAGGATGTAAGGTTCAAGTGGACAACATCCCAATATAC CAGATTTGTAAGCACAACAGGATGTAAGGTTCAAGTGGACAACATCCCAATATAC	300 244	Original Sequenciada	CAGCTAAACCGGAAGTGGAAATGAAACGGAGCTCAGAGATGATCGACGCTCAAT CAGCTAAACCGGAAGTGGAAATGAAACGGAGCTCAGAGATGATCGACGCTCAAT	360 292
Original Sequenciada	CTGGTTTGCAGAGAGTCTTCTACTCCCAATGACTTCAAGATAACTATCGCTA CTGGTTTGCAGAGAGTCTTCTACTCCCAATGACTTCAAGATAACTATCGCTA	360 304	Original Sequenciada	GCAGTTGGAGTCAAGATCATTGATGTTGTTCTAAATCATATGGTGGAGTCAACAG GCAGTTGGAGTCAAGATCATTGATGTTGTTCTAAATCATATGGTGGAGTCAACAG	420 352
Original Sequenciada	TTCAAGAAAGTGAATACCGCACTCAAGACTTGGATTAATTAATAAATTTAGAAAA TTCAAGAAAGTGAATACCGCACTCAAGACTTGGATTAATTAATAAATTTAGAAAA	420 364	Original Sequenciada	AAGCGGGACAGATAAAGCGTCTTCCGCTCTCAATTCGATGCTGCCAGGA AAGCGGGACAGATAAAGCGTCTTCCGCTCTCAATTCGATGCTGCCAGGA	480 412
Original Sequenciada	CTGGCGATCTTTGGAGAACTTCACATCCCTCTGATGCAATCAGAGAGGAGCAT CTGGCGATCTTTGGAGAACTTCACATCCCTCTGATGCAATCAGAGAGGAGCAT	480 424	Original Sequenciada	GTGAAATTTCCCGAGTCCCTTAAATAAATGATTTCAAGACCGTGTGTAAAT GTGAAATTTCCCGAGTCCCTTAAATAAATGATTTCAAGACCGTGTGTAAAT	540 472
Original Sequenciada	TTTACAGCAGCAGCTCAAGTTAGCAGCACTGAGTTGATGTAATAAATGCCCTGTAA TTTACAGCAGCAGCTCAAGTTAGCAGCACTGAGTTGATGTAATAAATGCCCTGTAA	540 484	Original Sequenciada	CACGATTAAGAGCCGGATACCAATATGCCCCCATGTCAGAGGATGCCAGT CACGATTAAGAGCCGGATACCAATATGCCCCCATGTCAGAGGATGCCAGT	600 532
Original Sequenciada	GCAACGATACCCTACTTATGATTAATCCCGAGTCTGGCTCAAAGCCAGTACTG GCAACGATACCCTACTTATGATTAATCCCGAGTCTGGCTCAAAGCCAGTACTG	600 544	Original Sequenciada	GTGGCTTGTGAGCTGAACAGGAAACAGAAATTCGGAGAGATGATTAATAT GTGGCTTGTGAGCTGAACAGGAAACAGAAATTCGGAGAGATGATTAATAT	660 592
Original Sequenciada	ATGATGAAAAGTGTGTAAGACGGTGAAGTGAAGTCTCGGAGCAGCAGTGTCA ATGATGAAAAGTGTGTAAGACGGTGAAGTGAAGTCTCGGAGCAGCAGTGTCA	660 604	Original Sequenciada	CTTAATACTGATGAGTTGGAGTGTGCTGATTCGTTGATGATCAAAACATG CTTAATACTGATGAGTTGGAGTGTGCTGATTCGTTGATGATCAAAACATG	720 652
Original Sequenciada	TCCAAGCGGGCCATATGTTGTAAGGAGGAGCTTCACTCTCTTCTAGACTC TCCAAGCGGGCCATATGTTGTAAGGAGGAGCTTCACTCTCTTCTAGACTC	720 664	Original Sequenciada	TGGCAGTCACTAAAATGATTTGGAGGAGTGAACATTAAGATCTGATCAGG TGGCAGTCACTAAAATGATTTGGAGGAGTGAACATTAAGATCTGATCAGG	780 712
Original Sequenciada	AGSGACACTCTGATACCGTACACATCAACAAGAAATGCCGAAAATGACGAC AGSGACACTCTGATACCGTACACATCAACAAGAAATGCCGAAAATGACGAC	780 724	Original Sequenciada	CTTGATTAAGTGAAGGATCTCTATAGATCTCCGAGAAACCAAGCACTTTGTT CTTGATTAAGTGAAGGATCTCTATAGATCTCCGAGAAACCAAGCACTTTGTT	840 772
Original Sequenciada	CGTTCGAAAAAATAATTAATTCAGCGGCTGTGGAAAATCTTTTGTCTGCTGCT CGTTCGAAAAAATAATTAATTCAGCGGCTGTGGAAAATCTTTTGTCTGCTGCT	840 784	Original Sequenciada	GTCCATGAGTCAAGCAGGAGGAGAGCCCTTAAGCTGACCAATATCTCGAATC GTCCATGAGTCAAGCAGGAGGAGAGCCCTTAAGCTGACCAATATCTCGAATC	900 832
Original Sequenciada	ACGCTCTCAATTTGGGCTGTTTGTGGCGAAAATCTTATAATATCTACGGTATC ACGCTCTCAATTTGGGCTGTTTGTGGCGAAAATCTTATAATATCTACGGTATC	900 844	Original Sequenciada	GGAGTACACTACTTCAATTTGGAGCAGCCCTGATCGGCACTTGAAGAAGATTC GGAGTACACTACTTCAATTTGGAGCAGCCCTGATCGGCACTTGAAGAAGATTC	960 892
Original Sequenciada	CCCAAAATTTCTATGAAAAAAGAAATGCAAAAAAGCCATGCGCTTTTGTGATTT CCCAAAATTTCTATGAAAAAAGAAATGCAAAAAAGCCATGCGCTTTTGTGATTT	960 904	Original Sequenciada	GAGTTCGATGCTCAACGCTAATGAGCAATTTTAAAGCAGCTTCTGATAT GAGTTCGATGCTCAACGCTAATGAGCAATTTTAAAGCAGCTTCTGATAT	1020 952
Original Sequenciada	GATCATCTCTTTGGGATCAATACAGCAGTGAAGAACGTTTATTATAGAGCTTAG GATCATCTCTTTGGGATCAATACAGCAGTGAAGAACGTTTATTATAGAGCTTAG	1020 928	Original Sequenciada	GGGAGCGGATTTCCAGCTAATGAGGCTTTTAAATGATCAAACTATGCGACAA GGGAGCGGATTTCCAGCTAATGAGGCTTTTAAATGATCAAACTATGCGACAA	1080 1012
Original Sequenciada	-----	0	Original Sequenciada	CCATGATTAACAAAGAGCAATATCCATATGTTGGTACATATAAGAAATCAAGCCATA CCATGATTAACAA	1140 1026
Original Sequenciada	-----	0	Original Sequenciada	-----	0
Original Sequenciada	-----ATGA-----AACT-----TGTATATG CACTGTAAATACGCTCCAGAGGACTATTTAAAGTTTCAGACAAAATTAATGCTACGGG	19 120	Original Sequenciada	GGAGGTTTATGGACACAGACTTCCGGCTCATATGATGTTGGTGGCAGCTT GGAGGTTTATGGACACAGACTTCCGGCTCATATGATGTTGGTGGCAGCTT	180 91
Original Sequenciada	TGCTGTTTTCGTTTATATGTTGCTGCTGACGGCTTAAAGTGGAGAAAGGAT ACTGTTTTCGTTTATATGTTGCTGCTGACGGCTTAAAGTGGAGAAAGGAT	78 178	Original Sequenciada	GCATCGCGAAGGAGCTAGGAGAGGTTTAAATGAGAAATGATTAAGATTAATC GCATCGCGAAGGAGCTAGGAGAGGTTTAAATGAGAAATGATTAAGATTAATC	240 151
Original Sequenciada	GAGAAAACCTGGTGAATAT-----ACATATATATCTATAAATGATGTTAATGT TGCTCAAAAATGGTGGCTTACTTACCGTTTTATGCTATGGCTTAAATTTACTTT-	134 237	Original Sequenciada	GGGCTTAAGTACCAATAAAGCTATATGTTGGGATTTTACATGATCAAT GGGCTTAAGTACCAATAAAGCTATATGTTGGGATTTTACATGATCAAT	300 211
Original Sequenciada	TGCTTAATGAAAAATGATCAACTGATTAATTTTCCAATGATTTTGTATATCGA -----TCTGATAGAGCC-----CTGGTGGTTTATACACTGAAATGATCTGCCCTAAT	194 290	Original Sequenciada	CAATTAATCTAGAGAAAGTACAGATCTGCTGCTTCCCTCAAGTTTGGCTTTTA CAATTAATCTAGAGAAAGTACAGATCTGCTGCTTCCCTCAAGTTTGGCTTTTA	360 271
Original Sequenciada	ACAAAAATTTTATAGATGTTGCTGACCAAAATGGATTCCCGACA-ATCGAATC ATGACA-----ATTAGCTTTTACAGCTCCCAAGTGGTTTAAACCGGCCCTTTT	313 345	Original Sequenciada	TATTTACGATCACTGGGATAAAGAACTAACGTTAGTATAGCTAAAATGAGAAAA TATTTACGATCACTGGGATAAAGAACTAACGTTAGTATAGCTAAAATGAGAAAA	420 331
Original Sequenciada	TCTCAAAAATGTTGCTGATGCTTCTCCGAAGCTGATGACAAAGTGGCTGATGAA TCCGAAAACCT-----TCCG-----TAAATCAATGATTTTATGAGAGTTTCCCTGT-GTG	313 398	Original Sequenciada	ATGGGATATAAGTCCCGGAGCATCGTGCACAACTCAACCCAGCAGCATTTAA ATGGGATATAAGTCCCGGAGCATCGTGCACAACTCAACCCAGCAGCATTTAA	480 391
Original Sequenciada	AGAAAGAACTAAAGTGGTGAAGAGATGAGGAGTAACTACTCAACTCCGGCTCC ATTCCAACAGTATTAGCACCAG-----ACTACTTTTGT	373 433	Original Sequenciada	AAAATCTATATAGTAAATAAATCTTTCAGTTCCGGTACCACTTTTAAATCTTT AAAATCTATATAGTAAATAAATCTTTCAGTTCCGGTACCACTTTTAAATCTTT	540 451
Original Sequenciada	AAACAAAGTCAAGAAAGAGGAGCAATCTCATCAAAAATTTGACAACTAC A-----AGGATAACAGAGTCTCCGATGCTTCAAGAGGATTTTCTATCGG	433 486	Original Sequenciada	CTCTCAAGTTTAAAATCCCTTAATCCCACTCCCTCAATTCAGGAGCTCTCGAC CTCTCAAGTTTAAAATCCCTTAATCCCACTCCCTCAATTCAGGAGCTCTCGAC	600 511
Original Sequenciada	AGCCATGCTACGAG-----AATTAATGGAGAGC----- TGCTCTGGTGAATAAGTACGCTGATGATTAATTTACTAAATGCTGCTATTGCA	465 546	Original Sequenciada	CCCTGTCGCTGGCAGGAAAGCAAGCTAAAGACCCCGCTCCGCTGCTGAC CCCTGTCGCTGGCAGGAAAGCAAGCTAAAGACCCCGCTCCGCTGCTGAC	660 571
Original Sequenciada	-----GAGAGCGGATGATGACGAAGAAGGGGAAAAAGCA-----AGAAGA GTGACTTGGAGTAAATTTTAAAGATGTTGGCTCACTAGTATGCTAGTGA	512 606	Original Sequenciada	ATCAACAGACAGCCCTGGAGGAGCGAGCCGCTGCGCTGGCAGCAAGGGCTC ATCAACAGACAGCCCTGGAGGAGCGAGCCGCTGCGCTGGCAGCAAGGGCTC	720 631
Original Sequenciada	AAACCGAAGCATTGGACAGTGGGAGC-----GCAAGGATTTCCGACT CAAGCTATGTTGATTTTACGCTTAAGGCTTCCCACTGGTTACAACTTCAAAAGC	564 666	Original Sequenciada	GGTACATGCTCCCGAGCAGCCCTGCGCTCAACGACCCCTGCTCAGGATTT GGTACATGCTCCCGAGCAGCCCTGCGCTCAACGACCCCTGCTCAGGATTT	780 691
Original Sequenciada	TTGGCGCCCATGCGGAATTAAGCAGCTTC-----GAGCATCAATTAACATGAAGA -----GAGCATCAATTAACATGAAGA	620 726	Original Sequenciada	GGGCGGTAAGATGCGGACAGCAGAGCGGATGCTGCTGCTGCTGATGAGCT GGGCGGTAAGATGCGGACAGCAGAGCGGATGCTGCTGCTGCTGATGAGCT	840 751
Original Sequenciada	GTCAAAATTCAGCAGCTAG-----GAGCATCAATTAACATGAAGA CTGCTCCCTGATGCGGATTTCTTTTACACTG 762	620 762	Original Sequenciada	ACCTTCCAGGAGCCGATTAAGGAAAGAAATTCGTTCAAGTGGTTGGGGCT ACCTTCCAGGAGCCGATTAAGGAAAGAAATTCGTTCAAGTGGTTGGGGCT	900 811
Original Sequenciada	-----	0	Original Sequenciada	TGAAAAATTTGGGATTTCTGGTGGTATTTTGAATTTTAAAATTCGGCTAGA TGAAAAATTTGGGATTTCTGGTGGTATTTTGAATTTTAAAATTCGGCTAGA	960 871
Original Sequenciada	-----	0	Original Sequenciada	ACATTCCTATGGGCTGAAAATACATGCTCAAAATTTAGCTTTACTTCAAATACAG ACATTCCTATGGGCTGAAAATACATGCTCAAAATTTAGCTTTACTTCAAATACAG	1020 931

Anexo G: Resultados da amplificação dos fragmentos por RT-PCR. Os fragmentos de todos os genes foram validados e os tamanhos estão compreendidos até aos 200 bp. Legenda: BUX_00351_434 (1), BUX_00713_957 (2), BUX_00422_33 (3), BUX_00422_152 (4), BUX_00397_6 (5) e BUX_01281_82 (6). Marcador utilizado: *NZYDNA Ladder V*.



Anexo H: Localização dos genes candidatos nas glândulas esofágicas ou nos intestinos por hibridação *in situ*. Legenda das sondas sense: BUX_00351_434 (A), BUX_00713_957 (B); BUX_00422_33 (C); BUX_00422_152 (D); BUX_00397_6 (E); BUX_01281_82 (F). Ampliação das imagens é 200x.

