



**Francisco Miguel
Piçarra Leisico**

**Descoberta de marcadores de patogenicidade em *B.*
*xylophilus***



**Francisco Miguel
Piçarra Leisico**

Descoberta de marcadores de patogenicidade em *B. xylophilus*

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, Ramo de Biotecnologia Molecular, realizada sob a orientação científica da Doutora Conceição Egas, diretora da Unidade de Serviços Avançados do Biocant e do Professor Doutor Jorge Saraiva investigador auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Trabalho financiado por fundos FEDER através do Programa Operacional Factores de Competitividade (COMPETE) e por fundos nacionais da Fundação Portuguesa para a Ciência e Tecnologia, projecto PTDC/AGR-CFL/098916/2008, FCOMP-01-0124-FEDER-008794."

o júri

presidente

Prof.^a Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo

Professora associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof.^a Doutora Marta Wilton Pereira Leite de Vasconcelos

Investigadora auxiliar na Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa

Prof. Doutor Conceição Egas

Investigadora do Biocant

agradecimentos

Pai e Mãe, obrigado por ser feliz. Só assim faz sentido existência do sentimento de realização pessoal, o qual quero partilhar com vocês. Este trabalho é o fruto da estabilidade e felicidade partilhada em família, com vocês e a Carolina. E todos. A felicidade só é real, quando partilhada. – “Happiness is only real when shared”

Carolina desejo um dia ler os teus agradecimentos, do que quer que seja. Se assim o desejares!

Liliana, meu abrigo. Influente e determinante num mundo que é só meu e arriscaste entrar. Permites o sonho e equilibras a descida real até à Terra. Obrigado por esse equilíbrio. Um sincero e prolongado Obrigado.

Agradeço à Dra. Conceição pelo apoio ao longo do desenvolvimento da tese e acima de tudo pela formação e contribuição no processo de “pensar”.

À família dos serviços avançados, sem exceção. Todos contribuíram para a motivação diária de encarar os novos problemas. Obrigado por tudo e espero que o ambiente frutífero continue, agora no novo espaço! Um especial agradecimento à Tânia pela disponibilidade e profissionalismo e sem dúvida uma peça determinante no sucesso deste nosso trabalho, à Paula e à Maria José pela formação laboratorial e de análise de dados e ao amigo Felipe pelo apoio informático e paciência durante todo o tempo.

Sendo esta dissertação o culminar de uma “longa” jornada académica, os pilares dos melhores anos da minha vida têm de ser mencionados. Amigos de curso são únicos e não serão esquecidos. Esses serão eternos. A Santiago, fica a saudade, de tudo e todos. Mais que um lar, uma família. Um agradecimento sincero ao Beira Vouga por ter permitido a permanência do simbionte “bola”. Envolvido em tudo e nada, um abraço ao praça Telmo Sousa. Foi um prazer ter-me cruzado consigo, Sir.

E sem dúvida que os amigos de casa são os mais ausentes mas mais presentes. Um grande agradecimento a todos os meus amigos de Serpa.

Agradeço também, com grande reconhecimento, aos novos colegas da FCT pelo apoio e compreensão, em especial à Teresa e Márcia. Obrigado pelo apoio.

Por último mas não menos importante, ao Sérgio. Foi a primeira mas espero que não tenha sido a última. Boa surpresa do puto!

Cumprimento especial ao “Toshiba”, guerreiro de uma vida!

Obrigado a todos os que se cruzaram na minha vida, pois por mais pequena a contribuição, tornou-me uma pessoa melhor, ou pelo menos, feliz.

Um bem-haja!

palavras-chave

B. xylophilus, nemátode da madeira do pinheiro, doença da marchidão do pinheiro, mecanismo molecular de patogenicidade, marcadores de patogenicidade, interações planta-nemátode, transcrito, anotação funcional, RT-qPCR

resumo

Bursaphelenchus xylophilus, o nemátode-da-madeira-do-pinheiro, é o agente causador da doença da marchidão do pinheiro e é considerado uma das mais perigosas pragas para os ecossistemas onde foi introduzido. A biologia e ecologia do nemátode que estão estritamente associadas à indução da doença têm sido extensivamente estudadas. No entanto, as interações desencadeadas entre as plantas e os nemátodes durante o desenvolvimento da doença da marchidão do pinheiro continuam por esclarecer.

Para elucidar esta interação utilizou-se uma abordagem de transcriptômica comparativa. O transcrito de *B. xylophilus* foi comparado com o de *B. mucronatus*, um nemátode filogeneticamente próximo e incapaz de induzir marchidão em pinheiros. Adicionalmente, foram comparados entre si, os transcritos de *B. xylophilus* machos, fêmeas e JIII, isolados de pinheiro, assim como estes três transcritos contra o de *B. xylophilus* crescido em fungo.

Diversas estratégias de transcriptômica comparativa e diferentes ferramentas bioinformáticas foram integradas, permitindo a identificação de 28 genes cuja expressão relativa foi quantificada entre as amostras em estudo por RT-PCR. Todos os genes analisados apresentam níveis de expressão significativamente diferentes entre as amostras, com prevalência na comparação entre nemátodes crescidos em fungo e planta.

As estratégias utilizadas identificaram o metabolismo do homogentisato como diferencialmente ativo entre as amostras. O envolvimento deste composto no combate ao stress oxidativo sugere a sua potencial ação no mecanismo de parasitismo do nemátode. Esta é a primeira evidência da ativação deste mecanismo em *B. xylophilus*, com especial interesse na sua ativação em planta durante o parasitismo.

Genes de fosfatases ácido roxas, catepsina L e cistatina 5 apresentaram os maiores níveis de expressão em nemátodes crescidos em planta face a fungo, apresentando sobre-expressões de 200, 110 e 16 vezes superiores, respetivamente. As fosfatases ácido roxas são potencialmente secretadas e podem estar envolvidas na produção de espécies reativas de oxigênio. A catepsina L pode promover uma interação direta entre o nemátode e o pinheiro, sendo um alvo já estudado para controlo de nemátodes parasitas de plantas. A cistatina 5 tem sido associada a um mecanismo de fuga ao sistema de reconhecimento de hospedeiros em nemátodes parasitas.

Outros genes foram identificados neste estudo como o da trealase, uma enzima que actua sobre trealose, um polissacarídeo associado à detoxificação oxidativa em nemátodes. Várias proteínas envolvidas no proteossoma celular, nomeadamente na garantia da produção de enzimas funcionais, foram também evidenciadas. A ativação deste processo poderá permitir uma ação mais rápida na resposta do nemátode a estímulos externos como os encontrados dentro do pinheiro.

A análise experimental futura dos genes estudados evidenciará processos relevantes na biologia e no parasitismo do nemátode e poderá revelar a potencialidade de utilização de alguns deles no controlo do nemátode.

keywords

B. xylophilus, pinewood nematode, pine wilt disease, pathogenicity molecular mechanism, pathogenicity markers, plant-nematode interactions, transcriptome, functional annotation, RT-qPCR

abstract

Bursaphelenchus xylophilus, known as the pinewood nematode, is the causative agent of pine wilt disease and is considered one of the most dangerous pests to worldwide ecosystems where it was introduced. Pinewood nematode biology and ecology that are strictly associated to disease induction have been extensively investigated. However, plant-nematode interactions triggered during pine wilt disease development remain unclear.

A comparative transcriptomics approach was used to elucidate this interaction. *B. xylophilus* transcriptome was compared to transcriptome of *B. mucronatus*, which is a phylogenetically close nematode of *B. xylophilus* and unable of wilting in pine trees. Additionally, the transcriptomes of *B. xylophilus* males, females and JIII isolated from pine trees were compared among them and against *B. xylophilus* grown on fungi.

Several strategies of comparative transcriptomics and different bioinformatics tools were integrated allowing the identification of 28 genes. Their relative expression was measured in all samples under study by RT-qPCR. All analyzed genes presented levels of expression significantly different, with special attention on the comparison of nematodes grown in fungi and plant.

The strategies used identified homogentisate metabolism as differentially activated between samples. The role of homogentisate in oxidative stress detoxification suggests their potential action in the parasitism mechanism of nematode. This is the first evidence of the activation of homogentisate mechanism in *B. xylophilus*, including their presence during parasitism.

Genes of purple acid phosphatases, cathepsin L and cystatin 5 presented the highest expression levels in nematodes grown on pine comparing to those grown on fungi. Their expression levels were of about 200, 110 and 16 times, respectively. Purple acid phosphatases are probably secreted and are involved in reactive oxygen species production. Cathepsin L may promote a direct interaction between the nematode and pine, being a target already studied for plant parasitic nematodes control. Cystatin 5 has been associated with a host recognition of parasitic nematodes escape mechanism.

Other genes were identified in this study, such as trehalase, the enzyme that cleaves trehalose. This polysaccharide is involved in nematode oxidative detoxification. Several proteins involved in the production of cellular proteasome, particularly in ensuring the production of functional enzymes were also evidenced. Activation of this process may allow a faster response to external stimuli such as those occurring inside the pine tree.

The future experimental analysis genes identified will elucidate relevant processes in *B. xylophilus* biology and parasitism. Some of these genes may become useful for nematode control.

Índice

Índice de figuras	IV
Índice de tabelas	V
Abreviaturas.....	VI
Introdução.....	1
1. Nemátode-da-madeira-do-pinheiro	2
1.1 História, distribuição e impactos	2
1.2 Biologia.....	4
1.2.1 Ciclo de vida.....	4
2 Patogenicidade do <i>B. xylophilus</i>	8
2.1 Mecanismos de patogenicidade	10
2.1.1 Sintomas externos.....	11
2.1.2 Desenvolvimento fisiológico da DMP e sintomas internos.....	12
2.1.3 Comportamento dos nemátodes durante o desenvolvimento da DMP.....	18
2.2 Bactérias como fator de patogenicidade na DMP.....	20
2.3 Genes relacionados com a DMP.....	23
2.3.1 Enzimas degradadoras da parede celular de plantas.....	23
2.3.2 Expansina	26
2.3.3 Proteínas alergénicas	26
2.3.4 Calreticulina.....	27
2.3.5 Peroxirredoxina	27
2.3.6 Acetilcolinesterases	28
2.3.7 Projeto de sequenciação do genoma do <i>B. xylophilus</i>	29
3. Abordagens de elucidação do mecanismo molecular da DMP	32
3.1 Transcritômica	33
3.1.1. Tecnologias NGS.....	33

3.2	Transcritômica comparativa.....	35
3.2.1	<i>B. mucronatus</i> como nemátode de comparação na pesquisa sobre a DMP, através da abordagem de transcritômica comparativa.....	35
4	Abordagens e objetivos do projeto	39
	Materiais e métodos.....	43
1.	Materiais biológicos	44
1.1	Cultura dos nemátodes.....	44
1.2	Inoculação dos nemátodes em pinheiros e a sua recuperação	44
1.3	Extração de RNA.....	45
1.4	Síntese de cDNA.....	45
2.	Pirosequenciação	46
3.	Pipeline de processamento das <i>reads</i> e anotação dos contigs	46
4.	Anotação funcional metabólica dos sistemas biológicos	48
5.	Anotação de peptidases	48
6.	Anotação de carboidrases	49
7.	Proteínas de potencial mimetização de proteínas de plantas.....	49
8.	Proteínas potencialmente secretadas para o meio extracelular.....	50
9.	Deteção de transcritos em <i>B. xylophilus</i> ausentes em <i>C. elegans</i>	50
10.	Mapeamento dos contigs no genoma de <i>B. xylophilus</i>	50
11.	Validação dos níveis de expressão	51
11.1	Desenho dos primers	51
11.2	Ensaio RT-qPCR	51
	Resultados e discussão	53
1.	Produção de material genético para sequenciação	54
2.	Processamento dos dados da sequenciação	55
3.	Anotação funcional metabólica	59
4.	Redução da redundância nos transcritomas.....	63

5.	Transcritômica comparativa a partir de <i>clusters</i>	64
5.1	Comparação entre <i>B. xylophilus</i> e <i>B. mucronatus</i>	65
5.1.1	Transcritômica comparativa integrada com Myrna.....	65
6	Análise final segundo Myrna.....	77
7	Quantificação dos níveis de expressão por RT-qPCR.....	83
7.1	Genes com potencial envolvimento conhecido no parasitismo de <i>B. xylophilus</i> 88	
7.1.1	Genes anotados pela estratégia BLASTP	88
7.1.2	Efetores conhecidos de <i>B. xylophilus</i>	103
7.2	Metabolismo do homogenisato.....	109
7.3	Peptidases.....	112
7.3.1	C-terminal hidrolases de ubiquitina.....	113
7.3.2	Catepsinas.....	117
7.3.3	Cistatinas	120
7.3.4	Glutathiona S-formil hidrolase	123
7.3.5	Família de proteases caseinolíticas.....	124
7.4	Proteínas secretadas	126
7.4.1	Fosfatases ácido roxas	127
7.4.2	Proteína 44 residente do retículo endoplasmático	128
7.4.3	Proteína 1 de ligação ao retinol e ácidos gordos	130
7.5	Trealase.....	132
	Conclusões.....	135
	Referências	141
	Material suplementar	159
1.	Avaliação do nível de similaridade cut-off.....	160
2.	Anotação InterPro das sequências específicas de <i>B. xylophilus</i> identificadas na abordagem de transcritômica integrada com Myrna	162
3.	Primers utilizados na quantificação por RT-qPCR	165

Índice de figuras

Figura 1 – Ciclo de vida de <i>B. xylophilus</i>	6
Figura 2 – Ilustração da porção anterior de nemátodes endoparasitas migratórios.....	10
Figura 3 – Desenvolvimento de embolismo nas traqueídeos de árvores infetadas com NMPs.....	15
Figura 4 – Secção transversal do tecido de xilema de <i>P. thunbergii</i>	16
Figura 5 – Estrutura tridimensional de um ramo de pinheiro.....	19
Figura 6 – Aplicações das tecnologias de sequenciação de próxima geração.....	34
Figura 7 - Esquema representativo da relação entre os objetivos do estudo e as abordagens utilizadas no seu desenvolvimento.....	41
Figura 8 - Equações matemáticas envolvidas no cálculo da expressão relativa por RT-qPCR.....	51
Figura 9 - Esquema ilustrativo da abordagem transcritômica comparativa integrada com Myrna.....	67
Figura 10 - Representação espacial de anotações KO obtidas por sequências específicas de <i>B. xylophilus</i> na via do metabolismo da tirosina, referente ao metabolismo do homogentisato.....	76
Figura 11 - Resultados de RT-qPCR dos genes identificados através da anotação contra a base de dados Swiss-Prot.....	93
Figura 12 - Resultados de RT-qPCR de genes efetores de <i>B. xylophilus</i>	104
Figura 13 - Resultados de RT-qPCR de genes envolvidos na via metabólica do homogentisato.....	110
Figura 14 - Resultados de RT-qPCR das peptidases de interesse identificadas.....	112
Figura 15 - Resultados de RT-qPCR de proteínas de interesse potencialmente secretadas por <i>B. xylophilus</i>	126
Figura 16 - Resultados RT-qPCR da trealase.....	134

Índice de tabelas

Tabela 1 – Efeitos putativos conhecidos de maior importância em <i>B. xylophilus</i>	30
Tabela 2 – Genes codificantes de potenciais efeitos detectados por EST e RNA-Seq em <i>B. mucronatus</i>	38
Tabela 3 - Resultados experimentais obtidos nos processos de extração de RNA total e síntese de cDNA.	55
Tabela 4 - Sumário dos resultados da montagem e anotação das sequências geradas na pirosequenciação dos cinco transcriptomas.	56
Tabela 5 - Mapeamento dos transcritos no genoma de <i>B. xylophilus</i>	57
Tabela 6 - Anotação funcional segundo os termos GO.	58
Tabela 7 - Anotação funcional dos transcritos pelo KEGG.	60
Tabela 8 - Distribuição dos transcritos nas vias metabólicas KEGG.	61
Tabela 9 - Redução da redundância através da ferramenta CD-Hit.	64
Tabela 10 - <i>Clusters</i> específicos de cada transcriptoma.	65
Tabela 11 - Exemplo dos resultados gerados pelo CD-Hit.	69
Tabela 12 - Constituição dos <i>clusters</i> de interesse gerados no pipeline da abordagem transcritômica comparativa integrada com Myrna.	70
Tabela 13 - Anotação segundo termos InterPro dos conjuntos de sequências de interesse obtidas na abordagem de transcritômica comparativa integrada com Myrna.	71
Tabela 14 - Representação das vias metabólicas KEGG de interesse em <i>B. xylophilus</i>	74
Tabela 15 - Identificação de famílias de peptidases e inibidores de peptidases nas sequências identificadas por Myrna.	78
Tabela 16 - Identificação de famílias de CAZymes nas sequências identificadas por Myrna.	81
Tabela 17 - Sequências de potencial mimetização de proteínas em planta identificadas pelo Myrna.	83
Tabela 18 - Genes selecionados para estudo por RT-qPCR.	85
Tabela 19 – Similaridade entre sequências de interesse detectadas nas bibliotecas de <i>B. xylophilus</i> e <i>B. mucronatus</i>	89
Tabela 20 - Anotação por homologia através de BLASTP contra a base de dados GenBank de NCBI.	91
Tabela 21 - Anotação das sequências de interesse por homologia com <i>C. elegans</i>	92

Abreviaturas

4HPPD	4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase
ABC	Cassetes de ligação de ATP ou ATP-binding cassette
AChE	Acetilcolinesterases
ASM	Ácido esfingomielinase
bp	Par de bases
CAL	Calreticulina
CAT	CAZymes Analysis Toolkit
CAZyme	Enzimas ativas na degradação de carboidratos
CAT	Catalase
JIII-JIV	Terceira e quarta etapa larval de sobrevivência
DMP	Doença da murchidão do pinheiro
EOPP	Organização de Proteção de Plantas Mediterrâneas e Europeias
RE	Retículo endoplasmático
ERC	Espécies reativas derivadas do carbono
ERK	Cinase regulada por sinais extracelulares
EST	Marcador de sequências expressas
FAH	Fumarilacetoacetato
FCE-1	Enzima 1 de conversão de proteínas farnesiladas
flp	Péptido tipo de FMRF
FTase	Farnesiltransferase
GHF	Família de glicosil hidrolases
GHF45	β -1,4-endoglucanase
GHF16	β -1,3-endoglucanase
GPX	Glutathione peroxidase
GST	Glutathione-S-transferase
HGD	Homogentisato 1,2-dioxigenase
HGT	Transferência horizontal de genes
IcmT	Enzima isoprenil cisteína carboxil metil transferase

ins	Proteína tipo de insulina
L1-L4	Primeira, segunda, terceira e quarta etapa larval juvenil
Lep d	<i>Lepidoglyphus destructor</i>
MAI	Maleilacetoacetato isomerase
NGS	Sequenciação de próxima geração
NF-κB	Fator nuclear kappa B
nlp	Proteína tipo de neuropéptido
NMP	Nemátode-da-madeira-do-pinheiro
NS-GPX	Glutaciona peroxidase independente de selénio
PCR	Reação de polimerização em cadeia
PEL	Pectato liase
PIB	Produto interno bruto
RT-qPCR	Quantificação em tempo real de PCR de transcrição reversa
RCE1	Enzima 1 de conversão de Ras
ROS	Espécies reativas de oxigénio
SOD	Superóxido dismutase
SDR	Desidrogenase/reductase de cadeia curta
TM	Domínio transmembranar
UGT	Uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferase
VAP	Venom allergen protein

Introdução

1. Nemátode-da-madeira-do-pinheiro

O nemátode-da-madeira-do-pinheiro (NMP), *Bursaphelenchus xylophilus* é o agente patogénico responsável pela doença de murchidão do pinheiro (DMP). Este nemátode está incluído na lista A2 de espécies em quarentena da Organização de Proteção de Plantas Mediterrâneas e Europeias (EOPP)¹, sendo considerado uma das pestes mais perigosas em todo o mundo. Devido ao seu impacto nas florestas onde foi introduzido, o NMP tem uma ação crítica nas economias nacionais, assim como na indústria da madeira de pinheiro.

Após o aparecimento da DMP no Japão em 1905, foi observada a sua rápida e mortífera propagação para outros países asiáticos. A doença de murchidão do pinheiro representa uma séria ameaça aos ecossistemas florestais e a descoberta da sua presença na Europa, mais precisamente em Portugal, desencadeou uma nova etapa de investigação sobre esta doença. Muitos estudos foram desenvolvidos com o intuito de aumentar o conhecimento científico sobre o desenvolvimento da doença, paralelamente, incidindo na biologia do *B. xylophilus* e as suas características ecológicas, obtendo-se, assim, a perceção da enorme complexidade que está associada a esta devastadora doença florestal.

1.1 História, distribuição e impactos

B. xylophilus foi primeiramente descrito nos Estados Unidos da América, como *Aphelenchoides xylophilus* por Steiner and Buhner em 1934². A primeira ocorrência da DMP ocorreu no Japão em 1905³, mas apenas em 1971 foram sugeridas as espécies *Bursaphelenchus* como agentes etológicos da patologia⁴. O NMP foi descrito como *Bursaphelenchus lignicolus* em 1972⁵, sendo dez anos depois, esta designação constituída sinónima do nome atual, *B. xylophilus*⁶.

B. xylophilus é endógeno da América do Norte⁷, onde as coníferas nativas são imunes ou altamente resistentes à DMP⁸. No início do século XX o NMP entrou no Japão através de produtos de madeira contaminados com o nemátode⁹. Apesar dos esforços para controlar a propagação da doença, o *B. xylophilus* alastrou-se para outros países asiáticos a Este do Japão como China, República da China e Coreia do Sul por meio de produtos de madeiras infetados.

Em termos dos impactos causados por esta peste florestal, o Japão é o país mais devastado, estimando-se perdas superiores a 46 milhões de metros cúbicos de árvores nos últimos 55 anos¹⁰. *B. xylophilus* foi reportado pela primeira vez na China em 1982¹¹ e a área florestal destruída tem aumentando desde então, atingindo uma média de 8 mil hectares por ano entre 1999 e 2006¹². Na Coreia do Sul, a primeira evidência da presença da DMP foi reportada em 1989¹³. No entanto, apenas a partir de 2005 foi detetada na maioria dos distritos onde está presente atualmente, revelando a ineficácia das medidas de controlo da propagação da peste após a sua entrada no país¹⁴.

Um dos eventos mais críticos na história da DMP foi a descoberta da doença na Europa em 1999, em Portugal¹⁵. A União Europeia solicitou medidas imediatas de prevenção como o isolamento da área infetada, a queima das árvores contaminadas com o nemátode e desenvolvimento de uma inspeção nacional de forma a avaliar a distribuição de *B. xylophilus* em Portugal¹⁵. O número de árvores com sintomas de declínio manteve-se inferior a 100 mil até 2004/2005 mas aumentou para mais de 250 milhares na avaliação de 2005/2006¹⁶, levando a novas ações de prevenção. Em 2011, mais de 400 milhares de árvores apresentaram sintomas de declínio¹⁷, revelando o atual impacto ameaçador da DMP para Portugal e, subsequentemente para a Europa. A ameaça desta peste é traduzida pela sua contínua propagação com a descoberta da doença em Espanha, em 2010¹⁸.

Adicionalmente à ameaça da DMP para com a ecologia ambiental das florestas em todo o mundo, esta também representa um sério risco para a economia dos países que apresentam condições favoráveis ao estabelecimento do NMP. A título de exemplo, a ameaça da DMP na Coreia do Sul justificou o aumento de fundos para o controlo do nemátode de 7,5 para 55 milhões de dólares no período entre 2004 e 2006¹⁴. Em Portugal, a ameaça da DMP é mais preocupante devido à importância do setor florestal na economia nacional, a qual representou em 2011 um saldo positivo de 2 mil milhões de euros, o que correspondeu a 1.1% do produto interno bruto (PIB) português¹⁹. Poucos estudos foram desenvolvidos para avaliar o real impacto económico e ecológico da introdução do NMP na Europa. Soleman e colaboradores²⁰ desenvolveram um software para modelar os impactos económicos da invasão do *B. xylophilus* na Europa, considerando os impactos económicos diretos, assim como, os impactos na sociedade. Os autores estimaram que o valor acumulado da perda de stock florestal durante um período de 22 anos, assumindo a inexistência de medidas de controlo, seria de 22 mil

milhões de dólares. No mesmo estudo, o impacto no bem-estar da sociedade a jusante do mercado da madeira foi estimado em 218 milhões de dólares para 2030.

A propagação do NMP representa um problema crescente na Europa nos próximos anos, estando associado a impactos económicos diretos nas florestas, nas indústrias de produtos florestais e na sociedade, assim como, representando uma ameaça aos ecossistemas florestais.

1.2 Biologia

A biologia do *B. xylophilus* é coordenada com o desenvolvimento de escaravelhos do género *Monochamus*. *B. xylophilus* reproduz-se sexualmente de uma forma amfimítica⁹ e alimenta-se de árvores saudáveis, assim como de fungos que colonizam árvores mortas ou em declínio. Os nemátodes são transmitidos entre árvores por escaravelhos vetor. A relação biológica entre o nemátode, o escaravelho vetor e a árvore hospedeira consiste num complexo sistema ecológico que proporciona o desenvolvimento da DMP.

1.2.1 Ciclo de vida

O ciclo de vida de *B. xylophilus* tem duas formas distintas, a fitofágica e a micofágica. A Figura 1 representa o sincronismo existente entre os ciclos de vida do NMP e os escaravelhos *Monochamus*. A forma fitofágica advém da transmissão do nemátode durante a alimentação de maturação do escaravelho para árvores saudáveis e representa a principal ameaça para o potencial desenvolvimento da DMP. A forma micofágica está associada à transmissão do nemátode durante a oviposição²¹.

O *B. xylophilus* desenvolve-se através das formas propagativa e dispersiva²². Como representado na Figura 1, as sucessivas etapas na fase propagativa são ovo, primeira, segunda, terceira e quarta etapa larval juvenil (L1, L2, L3 e L4, respetivamente) e adultos. Por sua vez, a forma dispersiva é representada pela terceira e quarta etapa larval de sobrevivência (JIII e JIV, respetivamente, que na Figura 1 correspondem a DL3 e DL4, respetivamente), também conhecidas por etapas *dauer*. A Figura 1 mostra que quando os nemátodes são transmitidos a árvores saudáveis durante a alimentação de maturação dos escaravelhos, eles alimentam-se das células da planta reproduzindo-se através da forma propagativa e, conseqüentemente, induzindo a

murchidão letal da árvore. Após a morte da árvore, o NMP continua a desenvolver-se pelo modo propagativo alimentando-se dos fungos que crescem nas novas condições propiciadas pelo declínio da planta. A partir de então, o NMP assume a forma micofágica, sendo esta idêntica à forma assumida pelo nemátode aquando da transmissão direta, durante a oviposição do escaravelho fêmea, a árvores em declínio ou previamente mortas²¹.

Várias espécies de coníferas estão associadas com o NMP como as dos géneros *Cedrus*, *Larix*, *Picea*, *Pseudotsuga* e *Pinus*, sendo as árvores do género *Pinus* consideradas as principais hospedeiras do nemátode^{23,24}. Acredita-se que o *B. xylophilus* consegue desenvolver-se em árvores mortas de todas as espécies deste género, no entanto, apenas um limitado número de espécies, enquanto árvores saudáveis, são suscetíveis a contrair a DMP após invasão do NMP. Como árvores adultas no seu ambiente ecológico natural, as espécies que têm sido extremamente danificadas e mortas pelo NMP são as espécies do Extremo Oriente *Pinus bungeana*, *Pinus densiflora*, *Pinus luchuensis*, *Pinus massoniana* e *Pinus thunbergii*, as espécies europeias *Pinus nigra* e *Pinus sylvestris* na América do Norte e *Pinus pinaster* em China e Portugal²⁴. Relativamente à forma micofágica, o NMP pode alimentar-se de fungos pertencentes às espécies dos géneros *Pestalotia* e *Rhizosphaera* em árvores vivas e fungos colonizados em árvores mortas como *Ophiostoma minus*, espécies *Ceratocystis*, espécies *Diplodia*, espécies *Pestalotia*, *Phialophora repens* e *Sphaeropsis sapinea*²⁵.

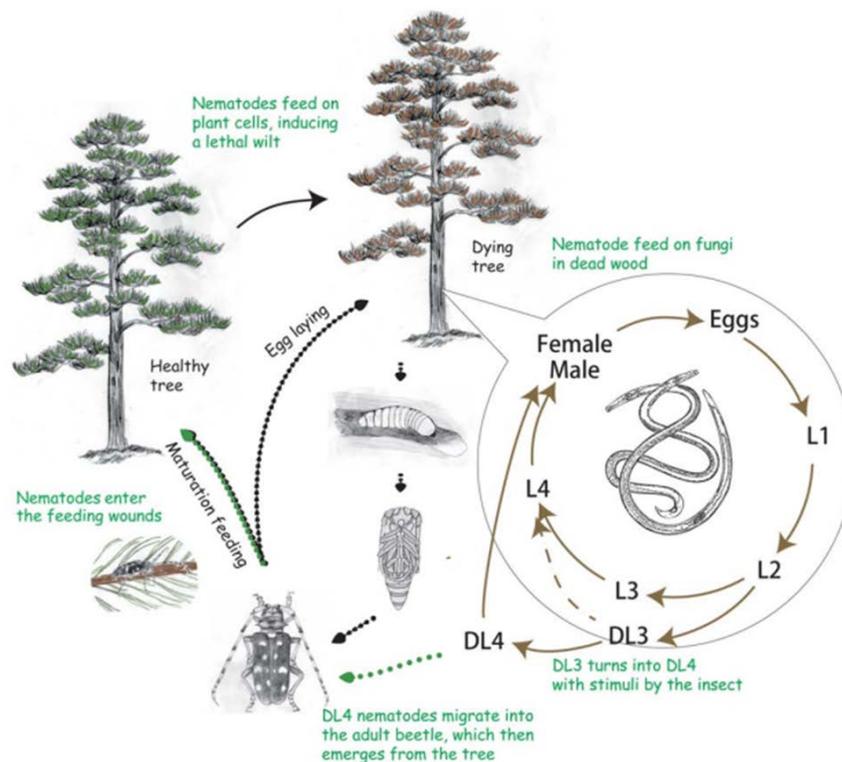


Figura 1 – Ciclo de vida de *B. xylophilus*. A relação mutualista entre ambos os ciclos de vida do NMP e do seu escaravelho vetor *Monochamus* está representada (ver texto para mais detalhes). L: fase larval; DL: fase larval de sobrevivência (DL3 e DL4 também são denominados por JIII e JIV, respectivamente). Adaptado de ²¹.

As espécies *Monochamus* são uma parte do complexo sistema ecológico da DMP e o conhecimento relativo ao seu ciclo de vida constitui um importante fator para a compreensão das múltiplas interações estabelecidas entre nemátodes e escaravelhos. Os escaravelhos do género *Monochamus* estão largamente distribuídos em todo o mundo mas os principais vetores do NMP são o *M. alternatus* no Extremo Oriente²⁶, *M. carolinensis* nos USA²⁷ e *M. galloprovincialis* em Portugal²⁸. O ciclo de vida de espécies *Monochamus*, de forma generalizada, começa pela deposição de ovos debaixo do súber de árvores mortas ou em declínio. Geralmente, os escaravelhos no seu primeiro, segundo e terceiro instar habitam no súber interior, enquanto no quarto instar escavam túneis até ao xilema, onde fazem as câmaras pupais. Os escaravelhos hibernam como larvas e pupam entre o final da Primavera e o início do Verão no ano seguinte. Por fim, emergem como escaravelho adultos, alimentando-se dos raminhos de árvores saudáveis²².

1.2.1.1 Relação mutualista entre as formas propagativa e dispersiva do NMP

Em adição à relação mutualista entre *B. xylophilus* e escaravelhos *Monochamus*, também as formas propagativa e dispersiva do NMP estabelecem relações mutualistas dentro de uma população de nemátodes.

O desenvolvimento do estágio L2 para JIII é uma etapa do ciclo de vida do NMP crucial para a transmissão do nemátode para novos hospedeiros pelos escaravelhos *Monochamus*, independentemente de serem árvores mortas (oviposição) ou saudáveis (alimentação de maturação). Esta etapa é despoletada como resultado de condições ambientais desfavoráveis ao normal crescimento do nemátode, como a ausência de alimento provocada quer pelo aumento da população na árvore morta, como pela progressiva dessecação desta²⁹. Kondo e Ishibashi³⁰ demonstraram que o estágio JIII possui características estruturais e biológicas como grandes quantidades de reversas lipídicas, as quais tornam potencialmente o estágio JIII num estágio especializado para a sobrevivência em condições adversas³⁰. Após o desenvolvimento para JIII, os nemátodes agregam em volta das câmaras pupais dos escaravelhos, provavelmente devido aos ácidos gordos como ácido palmitoleico, oleico e linoleico depositados nas paredes dessas câmaras pelas larvas no quarto instar²². Este evento de agregação fornece uma rica fonte de alimento para os nemátodes, permitindo o armazenamento de reservas lipídicas e, conseqüente, aumento de sobrevivência do nemátode durante a permanência de condições adversas ao normal desenvolvimento³¹.

O desenvolvimento do estágio JIII para JIV ocorre aquando da eclosão dos escaravelhos pupais das respectivas câmaras, tendo sido demonstrado por Necibi e Linit³² que este estágio pré-adulto dos escaravelhos é necessário para a muda de JIII para JIV. Os autores sugeriram que a formação do estágio JIV é induzida por substâncias específicas associadas à eclosão dos futuros escaravelhos vetor³². À semelhança do estágio JIII, também os nemátodes JIV têm grandes quantidades de reservas lipídicas, permitindo a sua sobrevivência em condições de escassez de alimento³⁰. Após a eclosão dos escaravelhos, considera-se que o dióxido de carbono libertado durante a sua respiração estimula a migração dos nemátodes JIV para os corpos dos escaravelhos pré-adultos (²² e referências contidas). Adicionalmente, foi cientificamente demonstrado que os nemátodes com maior conteúdo de lípidos (estágio JIV em comparação com o estágio JIII) são favoravelmente atraídos ao tolueno, um hidrocarboneto cuticular dos escaravelhos³³. Os nemátodes JIV depositam-se

principalmente no sistema traqueal dos escaravelhos, por onde são frequentemente transmitidos às novas fontes de alimento³⁴.

Os nemátodes libertam-se do escaravelho entre os 10 e 40 dias após a eclosão dos escaravelhos pré-adultos^{35,36}. A partida dos nemátodes dos escaravelhos ocorre quando estes estão em pinheiros e o momento da partida é afetado por fatores exógenos como substâncias voláteis da planta e fatores endógenos como o conteúdo lipídico do próprio nemátode³⁷. Ishikawa e os seus colaboradores³⁸ sugeriram que os monoterpenos produzidos pelas árvores, como β -mirceno, têm uma ação importante na atração dos nemátodes JIV para a árvore. Em adição, foi demonstrado que a diminuição do conteúdo lipídico dos nemátodes JIV, devido ao seu consumo durante a transmissão, pode levar à partida dos nemátodes a partir dos escaravelhos. Contrariamente, os nemátodes com maior conteúdo lipídico são mais atraídos ao tolueno³⁹.

As inter-relações entre o NMP e o seu escaravelho vetor originam uma associação mutualista entre ambos os organismos, na qual os escaravelhos servem de transportador dos nemátodes para novas fontes de alimento (árvores) e o nemátode induz a morte dessas árvores, no caso de a transmissão ocorrer para árvores saudáveis, que servirão de fontes de oviposição para os escaravelhos²².

2 Patogenicidade do *B. xylophilus*

Os nemátodes parasitas de plantas causam sérios impactos, especialmente na agricultura e a nível ecológico. Os nemátodes utilizam uma panóplia de estratégias para parasitar plantas, sendo classificados de acordo com a forma como interagem com a planta hospedeira, se alimentam e promovem a morte do hospedeiro. Os nemátodes parasitas de plantas são divididos em sedentários ou migratórios e ectoparasitas ou endoparasitas. Alguns nemátodes são ectoparasitas migratórios porque subsistem no exterior do hospedeiro, estabelecendo uma limitada interação com este. Os nemátodes denominados como ectoparasitas sedentários atuam da mesma forma que o grupo anterior, mas alimentam-se num único local durante um prolongado período de tempo. Os nemátodes endoparasitas migratórios invadem o hospedeiro e induzem extensos

danos à medida que migram, alimentando-se no interior dos tecidos das plantas. Os nemátodes endoparasitas sedentários alimentam-se durante um longo período de uma só célula, estabelecendo interações biotróficas altamente complexas com os hospedeiros. Este último grupo de nemátodes inclui os nemátodes formadores de cisto e os chamados “root knot nematodes”, sendo estes dois tipos de nemátodes os mais destruidores de plantas em todo o mundo causando efeitos devastadores em culturas agrícolas e, subsequentemente, grandes impactos económicos e sociais²⁴.

A maioria das espécies do género *Bursaphelenchus* alimenta-se de fungos e são transmitidas somente a árvores mortas ou em declínio por insetos vetores durante a oviposição. No entanto, algumas espécies, como *B. xylophilus*, são exclusivas quanto à sua habilidade de alimentar-se de árvores saudáveis assim como de fungos que colonizam árvores mortas ou em declínio. Assim, estas espécies podem representar uma origem independente de parasitismo de plantas relativamente recente²¹. É considerado que durante a evolução dos nemátodes, surgiu, de forma independente, a capacidade de parasitar plantas em pelo menos três momentos distintos. A emergente análise de dados moleculares evidenciou que a múltipla ocorrência de transferência lateral de genes, ou HGT (horizontal gene transfer), a partir de organismos como bactérias e fungos para nemátodes tem desempenhado um papel essencial na adaptação destes a novos estilos de vida⁴⁰. Em particular no género *Bursaphelenchus*, genes adquiridos a partir de bactérias e fungos em duas ocasiões distintas facilitaram a adaptação às estratégias de alimentação micofágica e fitofágica⁴¹.

A DMP ocorre como consequência da forma fitofágica do *B. xylophilus*, na qual os nemátodes entram nos pequenos ramos de árvores saudáveis através dos orifícios causados pela alimentação dos escaravelhos vetor. Após a entrada, os nemátodes migram, alimentam-se e reproduzem-se das células da planta causando a sua morte. Desta forma, o NMP é considerado um nemátode endoparasita migratório de plantas⁴².

O *B. xylophilus* é único comparado com a maioria dos nemátodes parasitas de plantas porque parasita a partir das partes superiores da planta e não entra pelo solo, migrando através dos tecidos da árvore. Uma das características mais importantes do grupo de nemátodes endoparasitas migratórios é o estilete, que corresponde a uma espécie de sonda utilizada por estes organismos para penetrar na parede celular das células da árvore, remover o conteúdo celular durante a alimentação e introduzir secreções nas células vegetais. As secreções são produzidas nas células das glândulas esofágicas, as quais estão divididas em dorsal e subventral. Como apresentado na Figura 2, o *B. xylophilus* apresenta uma glândula dorsal e duas subventrais⁴⁴.

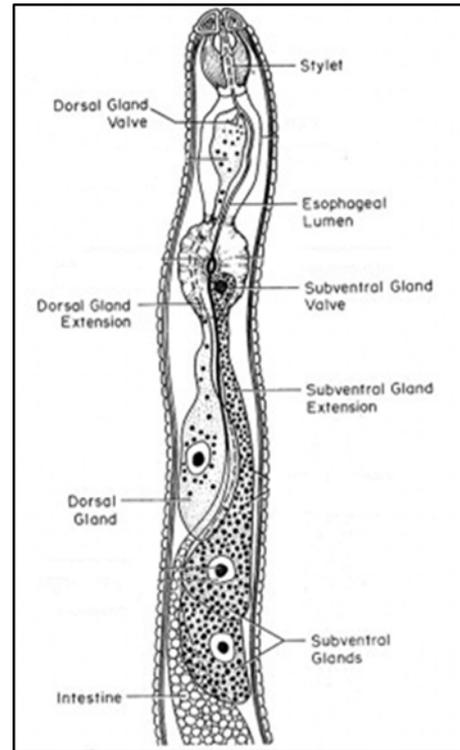


Figura 2 – Ilustração da porção anterior de nemátodes endoparasitas migratórios. Adaptado de ⁴³.

O desenvolvimento da DMP causada pela infecção das plantas com *B. xylophilus* está relacionada com as interações entre as populações de nemátodes, as espécies hospedeiras, condições ambientais e outros microrganismos associados quer aos nemátodes como às plantas.

2.1 Mecanismos de patogenicidade

Têm sido desenvolvidos grandes esforços a nível de pesquisa científica para descobrir o mecanismo de parasitismo através do qual o NMP induz a DMP. No entanto, vários aspetos continuam incompreendidos e algumas observações experimentais por explicar e relacionar num panorama macromolecular, considerando um cenário em volta do desenvolvimento da doença e dos seus fatores moleculares.

Fukuda, em 1997, sugeriu uma teoria sobre o mecanismo fisiológico dos sintomas de desenvolvimento da DMP baseando-se em evidências anatómicas e bioquímicas da árvore⁴⁵, sendo a teoria atualmente considerada⁴⁶. O modelo sugerido divide o desenvolvimento de sintomas nas etapas inicial e avançada da doença, as quais têm sido investigadas desde o final do século XIX⁴⁷⁻⁵². Na etapa inicial, um pequeno

número de nemátodes migra através dos canais de resina do córtex e xilema, a partir das feridas nos galhos das árvores, que são criadas pela alimentação dos escaravelhos que transportam os nemátodes. Ao longo do movimento nos canais, os nemátodes induzem a morte de células parenquimatosas e a sua presença nos canais contribui para o embolismo nas traqueídeos. Durante o desenvolvimento da DMP são observados dois eventos de embolismo, os quais contribuem para a perturbação da condução da seiva ao longo da planta. O primeiro é detetado na fase inicial enquanto o segundo é observado na fase avançada da doença. No entanto, apenas o primeiro foi reportado em ambas as árvores suscetíveis e resistentes infetadas quer por isolados virulentos como avirulentos do NMP⁴⁵. Nesta primeira fase não são detetados quaisquer sintomas externos e os pinheiros conseguem sobreviver se os sintomas não progredirem para a fase avançada da doença. A DMP desenvolve-se até à morte da árvore, situação verificada quando ocorre uma combinação hospedeiro-patogéneo compatível, ou seja, árvores suscetíveis infetadas por isolados de NMP virulentos. No início da fase avançada observa-se um incremento rápido da população de nemátodes e destruição do tecido cambial da planta⁴⁵. A necrose total das células parenquimatosas induz embolismo na planta, o qual eventualmente atinge o xilema externo e causa o bloqueio completo da condução de seiva ao longo da planta. Este bloqueio do fluxo de seiva leva à diminuição do potencial da água nas folhas e à cessação da fotossíntese. Ao longo do desenvolvimento da DMP, os sintomas externos observados são a cessação da exsudação de oleorresina e a descoloração das agulhas.

2.1.1 Sintomas externos

O mecanismo da DMP resulta de interações complexas entre o nemátode e a planta, enquanto a única contribuição do escaravelho vetor é a formação das feridas nos ramos superiores da árvore durante a sua alimentação, abandonando a árvore posteriormente. Estas lesões promovem a produção e exsudação de resina pelas células epiteliais⁵³, a qual contém terpenos voláteis e não voláteis⁵⁴. A exsudação da resina através das feridas leva à libertação dos componentes voláteis, os quais são tóxicos para os patogéneos externos como o NMP. A cristalização dos componentes não voláteis promove o fecho da ferida, impedindo que os NMP invadam a árvore^{53,54}. Hara e colaboradores⁴⁸ relacionaram a exsudação de resina com as etapas de desenvolvimento da doença através da observação de uma redução da exsudação de resina ao nono dia

após a inoculação dos nemátodes e a sua completa cessação na terceira semana, momento que coincide com o início da fase avançada de desenvolvimento da DMP.

Durante a fase inicial da DMP, as árvores infetadas com *B. xylophilus* não apresentam sintomas externos visíveis, o que dificulta a identificação da doença e, subsequentemente, uma rápida e eficaz intervenção. Apenas na fase avançada da DMP, na 3ª semana após a infeção, são detetados sintomas externos como a descoloração e a marchidão das agulhas por todo o pinheiro. Apesar dos sintomas externos não serem visíveis durante a fase inicial da doença, na fase avançada os sintomas referidos progridem rapidamente até à morte da árvore⁴⁸.

É importante referir que o desenvolvimento dos sintomas depende de várias circunstâncias como a idade da árvore, a composição do solo e das condições meteorológicas presentes durante esse desenvolvimento⁵³.

2.1.2 Desenvolvimento fisiológico da DMP e sintomas internos

Apesar do sucesso na prevenção da invasão inicial dos nemátodes através da exsudação de resina, existe ainda uma porção de nemátodes que consegue infetar a árvore por meio das feridas causadas durante a alimentação dos escaravelhos. Os NMPs migram dentro da árvore, deslocando-se ao longo dos ramos pelos canais de resina e atingem o tronco principal da planta⁵¹. Durante esta migração, as células parenquimatosas axiais, que rodeiam as células epiteliais dos canais de resina axiais, e as células parenquimatosas radiais são destruídas⁵⁵.

O sintoma interno primário corresponde à destruição dos canais de resina do córtex na zona mais recentemente formada dos ramos por onde os nemátodes entram na árvore⁵⁶. Esta evidência está de acordo com as observações de Son e colegas⁵¹, os quais demonstraram que os NMPs estão confinados aos canais de resina corticais logo após à sua inoculação (1 dia após a inoculação). Considera-se que ocorre um processo de ligno-suberização em volta dos canais de resina danificados e, em pinheiros resistentes, foi também verificada a formação de periderme na zona da ferida por onde os nemátodes invadem a planta^{45,54}.

Durante a invasão inicial dos nemátodes nos canais de resina corticais, e ao longo da rota de migração dos nemátodes é observada necrose e dilatação das células

epiteliais presentes nestes canais de resina^{47,55}. A libertação anormal de eletrólitos pelas membranas das células parenquimatosas corticais e a sua, conseqüente, morte são outros sintomas iniciais da DMP. Estes últimos sintomas são associados à reação de resposta da árvore perante o stress causado pela invasão e migração dos NMPs⁵⁷.

Observam-se alterações citológicas nas células parenquimatosas radiais do xilema na fase inicial do desenvolvimento da DMP, que constituem um sintoma integrante no próprio mecanismo desse desenvolvimento^{45,48}. Hara e colaboradores⁴⁸ observaram que lípidos neutros em gotículas lipídicas de células parenquimatosas tornavam-se ácidas devido à infecção dos nemátodes e que este conteúdo ácido difundia-se no citoplasma dessas células, contribuindo para a sua morte, no final da segunda semana após a inoculação dos nemátodes. Depois, os lípidos libertados eram difundidos para as traqueídeos vizinhas. A acumulação de taninos catecóis e perda de viabilidade nuclear nas células parenquimatosas radiais foram também observados. É considerado que este evento de perda de viabilidade celular é um indicador da mudança da fase inicial para a fase avançada de desenvolvimento da DMP^{45,48}.

As alterações citológicas das células parenquimatosas do xilema não são conseqüências do contacto direto das células com os nemátodes, que se movem ao longo dos canais de resina do xilema. Isto porque as evidências de destruição das células parenquimatosas são visíveis antes da destruição das células epiteliais do xilema, sintoma associado à migração dos nemátodes⁵⁸. Estes resultados suportam a teoria de que as alterações citológicas não são efeitos do dano físico provocado pela migração dos nemátodes, mas sim da reação de defesa das árvores de pinheiro hospedeiras como resposta a essa migração^{45,48}.

Os sintomas citológicos que podem ser relacionados com a reação de defesa da árvore não são observados em plântulas de espécies resistentes⁴⁸. Hara e colaboradores⁴⁸ sugeriram que a suscetibilidade de determinados pinheiros hospedeiros pode dever-se às respostas excessivas face à invasão dos nemátodes, em comparação às árvores resistentes. Esta sugestão baseou-se em observações, nas quais as árvores resistentes apresentaram respostas químicas e físicas mais agressivas (face às árvores suscetíveis) a nível no córtex e do floema na fase inicial da invasão e distribuição dos nemátodes, induzindo apenas respostas básicas a nível das células parenquimatosas radiais⁴⁸.

O início da fase avançada no desenvolvimento da DMP corresponde ao ponto de viragem fisiológico da árvore hospedeira, o qual é caracterizado por uma grande área de

necrose de células parenquimatosas e, conseqüentemente, cessação da reação de defesa à invasão dos NMPs⁵³.

2.1.2.1 Reação de defesa da árvore

As células parenquimatosas radiais pertencem a um grupo especializado de células em coníferas que estão envolvidas em processos específicos na reação de defesa da árvore⁵⁹.

As alterações citológicas nas células parenquimatosas radiais do xilema, que levam à sua morte, podem estar associadas ao metabolismo secundário como a reação de defesa da árvore, a qual inclui metabolitos como terpenóides, taninos, compostos fenólicos e estilbenóides^{45,60}. Esta teoria é consistente com o facto de que tanto a produção de terpenos como as alterações citológicas nas gotículas lipídicas de células parenquimatosas radiais de xilema começam 3 dias depois da inoculação dos nemátodes^{59,61}. Kuroda⁶⁰ demonstrou que as árvores suscetíveis aumentam a produção de terpenos voláteis como α -pineno, β -pineno, mirceno, β -felandreno e longifoleno em células parenquimatosas do xilema na fase inicial do desenvolvimento da DMP e atingem o máximo de produção em 2 semanas^{60,61}.

A produção de etileno é um evento considerado importante no desenvolvimento da DMP. Fukuda e colegas⁴⁵ reportaram, através da indução da produção de etileno em árvores suscetíveis saudáveis, a ocorrência de embolismo nas traqueídeos, o desaparecimento de gotículas de lípidos em células parenquimatosas do xilema e a sua lise, assim como, a morte de células parenquimatosas do córtex. Assim, Fukuda concluiu que a produção de etileno no xilema pode contribuir para as alterações citológicas nas células parenquimatosas⁴⁵. A produção de etileno é um sintoma fisiológico da reação de defesa da árvore face a patologias como a DMP porque este composto é produzido no local de infeções, atuando como composto de sinalização de forma a estimular as células vizinhas a ativar os seus mecanismos de defesa como a produção de terpenóides^{49,53,59}.

Em plântulas inoculadas com NMPs foram reportados 2 picos na produção de etileno, correspondendo às fases de desenvolvimento de sintomas na doença⁶². É considerado que o pico inicial pode estar relacionado com a lise das células parenquimatosas do xilema (fase inicial de desenvolvimento da DMP) e o segundo associado à necrose do câmbio vascular (fase avançada de desenvolvimento da DMP)⁴⁵.

O pico inicial foi encontrado em ambas as árvores suscetíveis e resistentes, enquanto o segundo pico apenas foi observado em árvores suscetíveis. Resultados similares foram reportados com a observação do pico primário em árvores inoculadas com isolados de NMP virulentos e não virulentos, ao passo que o pico secundário apenas foi observado apenas aquando da inoculação com isolados virulentos⁴⁵.

2.1.2.2 Eventos de cavitação

Na fase inicial de desenvolvimento da doença, antes do aparecimento de qualquer sintoma externo, é observado um evento de cavitação significativo. Este corresponde à rotura e bloqueio parcial da ascensão de seiva no xilema interno como consequência da disfuncionalização das traqueídeos^{52,53}. A incapacidade das traqueídeos disfuncionais em manterem a ascensão de seiva desde a raiz até ao topo da árvore leva à desidratação das próprias traqueídeos e, subsequente, enchimento com gases⁵³. A Figura 3 mostra o desenvolvimento de embolismo nas traqueídeos, o que corresponde ao aparecimento de bolhas no alburno do xilema da árvore e a sua rápida expansão e alastramento a traqueídeos vizinhas. Finalmente, a água presente nas traqueídeos saudáveis é drenada devido à tensão induzida pela transpiração das folhas da árvore⁵³.

A técnica de emissão acústica ultrassónica aplicada à deteção de eventos de embolismo em árvores vivas, mostrou que o aumento da frequência de emissão acústica está relacionado com a diminuição do potencial de pressão no xilema, dado que fornece informações relevantes sobre o evento de embolismo^{50,52}. Kuroda e colegas⁵² demonstraram que podem ser detetados dois eventos de embolismo distintos em *P. thunbergii* inoculada com NMPs, e que esses eventos estão correlacionados com o desenvolvimento de sintomas nos caules de pinheiros. O primeiro aumento da frequência de emissão acústica, ocorrido cerca de 10 dias depois da inoculação dos nemátodes e durante 3 dias (fase inicial da DMP), foi sincronizadamente associado com o aparecimento da desidratação de traqueídeos. O segundo aumento na frequência acústica foi observado na terceira semana (fase

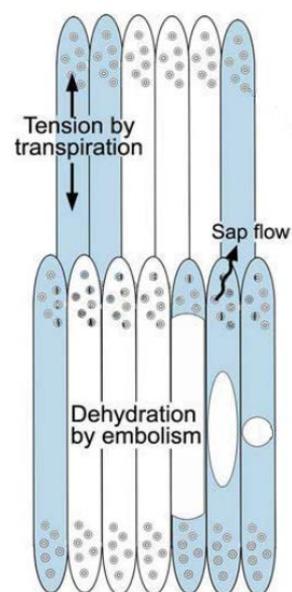


Figura 3 – Desenvolvimento de embolismo nas traqueídeos de árvores infetadas com NMPs (ver texto para mais detalhes). Adaptado de⁵³.

avançada da DMP), em correlação com o início da dessecação extensiva do xilema. Logo, estes resultados demonstram que a desidratação das traqueídeos durante o desenvolvimento da DMP é causada por alterações físicas na seiva⁵².

O mecanismo que explica como as traqueídeos se tornam disfuncionais não está totalmente compreendido. Existem evidências de que as células parenquimatosas do xilema desnaturadas estão distribuídas na mesma porção do caule do que o xilema embolizado, indicando que as alterações anatómicas destas células radiais do xilema induzem cavitação^{45,60}.

A relação entre os eventos de embolismo é apresentada na Figura 4. O primeiro aumento da frequência de emissão acústica, correspondente à diminuição do potencial da água, e pensa-se estar associado à mistura de substâncias na seiva em ascensão, sendo a tensão superficial dessas substâncias menor que a da seiva^{52,53}. Assim, a força de tensão da seiva torna-se mais fraca, o que em adição à tensão causada pela transpiração das folhas responsável pela subida da seiva, leva a um estado de embolismo nas traqueídeos^{52,53}. As substâncias que são consideradas como potenciais responsáveis da diminuição da força de tensão da seiva são os monoterpenos sintetizados pelas células parenquimatosas radiais do xilema e exsudados nas traqueídeos vizinhas⁶⁰. Existem evidências de que a tensão superficial de monoterpenos voláteis como o α -pineno é muito menor que a da água e que é observada desidratação das traqueídeos⁶¹ após a injeção artificial desde composto num caule saudável de *P. thunbergii*. Como a síntese de terpenos começa 3 dias após a inoculação dos nemátodes e progride durante 2 semanas, Kuroda⁵² teorizou que a exsudação de terpenos nas traqueídeos contribui para o embolismo patológico do xilema interno na segunda semana, na fase inicial do desenvolvimento da DMP.

Estas evidências são congruentes com a sugestão de que os dois eventos de cavitação são induzidos por diferentes mecanismos⁵². Os níveis de terpenos voláteis na planta, apesar do seu envolvimento na formação do evento de embolismo associado à

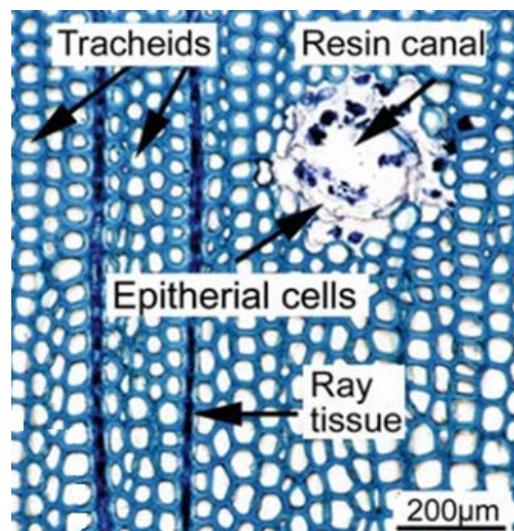


Figura 4 – Secção transversal do tecido de xilema de *P. thunbergii*. Esta representação da organização do tecido de xilema em pinheiros mostra a distribuição do tecido radial em relação às traqueídeos. Esta relação espacial justifica como o embolismo nas traqueídeos é facilitado pela lise das células parenquimatosas radiais. Adaptado de⁵³.

fase inicial da doença, decrescem entre a segunda e terceira semana⁶¹. Existem outras evidências que suportam esta teoria, como o facto dos dois aumentos da frequência de emissão acústica estarem temporalmente separados⁵². Adicionalmente, as árvores resistentes apenas apresentam o primeiro evento de embolismo, na fase inicial da doença, com o mesmo padrão de produção de terpenos que as árvores suscetíveis. No entanto, as resistentes diminuem a produção desses compostos e, conseqüentemente, recuperam e sobrevivem à infecção dos nemátodes. Já as árvores suscetíveis, para além do primeiro evento de embolismo, também sofrem do segundo evento, não recuperando da infecção e acabando por morrer⁶³. Resultados similares foram obtidos em ensaios desenhados para testar o desenvolvimento da DMP em árvores suscetíveis inoculadas com isolados de NMP virulentos ou não virulentos. O primeiro evento de embolismo foi observado em ambos os ensaios, mas a progressão da DMP apenas foi observada nas árvores inoculadas com os isolados virulentos, as quais evidenciaram o segundo evento de embolismo⁴⁵. Assim, é reforçada a ideia de que este segundo evento de aumento da frequência da emissão acústica não se deve à exsudação de terpenos nas traqueídeos vizinhas mas sim a outro mecanismo distinto⁵⁰.

O mecanismo que é considerado como estando relacionado com a progressão da dessecação do xilema e bloqueio completo do fluxo de seiva na fase avançada do desenvolvimento da DMP consiste na disrupção dos lípidos a partir das células parenquimatosas radiais nas traqueídeos, aquando da ocorrência das alterações citológicas, anteriormente mencionadas, nas células parenquimatosas^{52,53}. Esta consideração está relacionada com a evidência de que as árvores resistentes como *Pinus taeda*, nas quais os sintomas não progridem para além da fase inicial da doença, não apresentam tais alterações citológicas⁴⁸. Assim é sugerido que a cessação completa da ascensão da seiva pode ser promovida pela oclusão física das traqueídeos pelas gotículas lipídicas libertadas como resultado das alterações citológicas. Existem evidências de que este material lipídico é raro na fase inicial da doença, quando a área de células desidratada começa a aparecer. Por outro lado, a vasta quantidade de gotículas lipídicas exsudadas pelas células radiais adere à parede interna das traqueídeos à volta dos canais de resina e ao longo dos tecidos radiais, simultaneamente, quando a desidratação do xilema é extensa durante a fase avançada da doença, a partir da terceira semana de desenvolvimento da DMP^{52,64}. Estas gotículas lipídicas contêm substâncias repelentes da água, as quais aderem às membranas dos poros das traqueídeos e, conseqüentemente, impedem que as traqueídeos desidratadas recuperem a água,

evitando o restabelecimento do fluxo de seiva^{48,52,53}. No entanto, as substâncias que aderem às membranas dos poros ainda não foram identificadas⁴⁸.

Existe um momento importante na DMP, no qual a doença se desenvolve no caso de árvores suscetíveis ou esse desenvolvimento para e a árvore recupera dos sintomas da fase inicial, como acontece em pinheiros resistentes. Depois do primeiro evento de embolismo, uma aparente diminuição da reação de defesa da árvore face à invasão dos NMPs leva ao término da desidratação das traqueídeos em árvores resistentes⁶³. Contrariamente, as árvores suscetíveis progridem para a fase avançada da DMP, onde a desidratação das traqueídeos continua, o embolismo atinge o xilema externo, as células parenquimatosas perdem a viabilidade e a necrose de células do câmbio vascular começa^{48,60}. Estes sintomas induzem uma rápida diminuição do potencial da água, o que conseqüentemente, contribui para a diminuição da fotossíntese e transpiração nas folhas. Algumas teorias são consideradas para explicar esta rápida progressão dos sintomas mas o mecanismo ainda necessita de ser elucidado.

Recentemente, Umebayashi e colegas⁶⁵ demonstraram que eventos de embolismo verificados em árvores com a DMP foram induzidos sem a diminuição do potencial da água. Assim, os investigadores sugerem que o embolismo no xilema na DMP pode ser induzido pela diminuição da tensão superficial da seiva originada por atividade direta do NMP, contrariamente à normal associação com a mistura de terpenos com a seiva em ascensão⁶⁵. Esta sugestão baseou-se em evidências de que a tensão superficial da seiva decresce em coníferas pela adição de surfatantes, causando eventos de embolismo a níveis elevados de potencial da água⁶⁶.

2.1.3 Comportamento dos nemátodes durante o desenvolvimento da DMP

Inicialmente, os NMPs invadem a árvore através das feridas causadas pela alimentação dos escaravelhos, ultrapassando a barreira da resina exsudada⁵⁶. Os canais de resina são a rota principal da migração dos nemátodes dentro da árvore e durante a fase inicial da doença, onde os nemátodes se alimentam das células epiteliais, levando à sua morte^{47,55}.

Durante o desenvolvimento da doença, os NMPs são encontrados nos canais de resina do córtex, tecidos corticais, região cambial e canais de resina radiais e axiais do xilema^{47,51}. Os NMPs migram inicialmente dos canais de resina axiais do córtex para os canais de resina do xilema e, posteriormente, para os tecidos vizinhos como os tecidos corticais e cambiais⁴⁷. Tem sido hipotetizado, como apresentado na Figura 5, que os canais de resina radiais, os quais atravessam o câmbio a partir do xilema com as suas extremidades esféricas, não estão conectados aos canais de resina do córtex⁵¹. Esta hipótese está de acordo com os dados obtidos por Ichihara e equipa⁴⁷, sugerindo que quando as feridas de alimentação dos escaravelhos penetram até ao xilema, os NMPs conseguem atingir os canais de resina axiais e radiais do xilema diretamente. Por outro lado, quando as feridas de alimentação dos escaravelhos não atingem o xilema, os nemátodes têm de entrar nos canais de resina corticais, destruir as células em volta desses canais de forma a invadir o tecido cortical e, posteriormente, invadir as extremidades esféricas dos canais de resina radiais, que estão conectados com os canais de resina axiais do xilema (Figura 5)⁵¹.

Uma evidência relacionada com a patogenicidade efetiva do *B. xylophilus* consiste no facto de que os isolados de NMP virulentos possuem muito maior capacidade em invadir o tecido cortical que os isolados avirulentos^{47,51}. O mecanismo molecular desta capacidade diferenciadora não é, no entanto, totalmente compreendido⁶⁷. Adicionalmente, considera-se que a grande capacidade de migração e multiplicação dos isolados de NMP virulentos nos tecidos de xilema podem contribuir para um menor contacto com os terpenos tóxicos dentro da planta e, conseqüentemente, aumentar a capacidade de sobrevivência destes isolados de NMP, em comparação aos

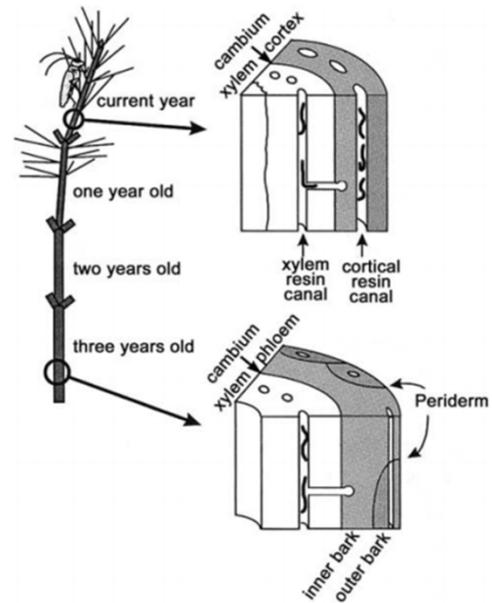


Figura 5 – Estrutura tridimensional de um ramo de pinheiro. De acordo com a idade do tecido da planta desde o topo até às raízes, a organização anatómica varia. Esta variação afeta a migração do nemátode ao longo da árvore e, dependendo da extensão da ferida causada pela alimentação do escaravelho, o NMP tem de se adaptar às diferentes condições que encontra. Esta rápida adaptação e respetivas interações patogénicas com a planta podem ser determinantes nas diferentes capacidades de parasitismo dos nemátodes patogénicos e não patogénicos. Adaptado de⁵³.

isolados avirulentos⁴⁷. No entanto, também o mecanismo que promove as reações de defesa na planta continua pouco conhecido e novos estudos irão elucidar como os nemátodes interagem com as plantas hospedeiras, permitindo que sobrevivam ou não durante o desenvolvimento da DMP.

Apesar das incertezas acerca do mecanismo de desenvolvimento dos sintomas da fase inicial para a fase avançada da doença, após o desaparecimento de algumas respostas de resistência da planta, a população de nemátodes aumenta rapidamente e torna-se apta a invadir os tecidos cambiais⁴⁸. Estas evidências estão de acordo com a conclusão de que a reação de defesa da árvore é efetiva na prevenção da migração e proliferação dos NMPs para os tecidos vizinhos aos canais de resina, na fase inicial da doença. No entanto, o mecanismo molecular que permite os NMPs sobreviverem a essas reações de defesa e respectivos metabolitos permanece desconhecido⁴².

O início da necrose cambial é consistente com os dados obtidos por Son e colaboradores⁵¹ que demonstraram a migração preferencial dos NMPs, na terceira semana após a inoculação dos nemátodes, para o tecido cortical e cambial a partir dos canais de resina. Os autores sugeriram que esta preferência pelas células parenquimatosas nestes tecidos pode estar envolvida com a maior capacidade de proliferação e acesso a fontes de alimento dos nemátodes, face à diminuição da reação de defesa da planta⁵¹.

Apesar do conhecimento de muitos eventos ocorridos durante o desenvolvimento da DMP, a completa compreensão dos sintomas da doença em relação a esse desenvolvimento permanece insuficiente, assim como, os mecanismos moleculares que promovem os sintomas inerentes. As evidências aqui relacionadas e discutidas expõem a urgência em investigar a patogenicidade do *B. xylophilus*, de forma a obter mais informação de como os NMPs induzem a DMP em pinheiros suscetíveis.

2.2 Bactérias como fator de patogenicidade na DMP

Durante muito tempo, a comunidade científica desenvolveu estudos sobre a DMP considerando o NMP como o único agente patogénico responsável pela formação da doença. No entanto, alguns investigadores tinham a opinião que outros organismos, como bactérias, poderiam possuir uma ação efetiva na patogenicidade e desenvolvimento da doença. De facto, existem evidências que algumas bactérias têm

uma associação simbiótica com o NMP⁶⁸ e que algumas espécies de bactérias isoladas destes nemátodes promovem a produção de ovos e a taxa de desenvolvimento, crescimento corporal em ambos os NMPs machos e fêmeas⁶⁹.

Atualmente, a dúvida sobre o papel de bactérias transportadas pelos NMPs na patogenicidade da doença mantém-se. Zhu e colaboradores⁷⁰ observaram que a inoculação de plântulas assépticas com NMPs assépticos ou com não assépticos causaram murchidão da planta, enquanto as inoculadas com as suspensões de bactérias extraídas dos nemátodes não murcharam. Assim, concluíram que a assepsia dos NMPs não causa a perda da sua patogenicidade⁷⁰. No entanto, Han e colaboradores⁷¹ desenvolveram um estudo similar, reportando que plântulas assépticas de pinheiros suscetíveis inoculadas com NMPs assépticos não causavam DMP, enquanto as inoculadas com NMPs assépticos e bactérias ou inoculadas apenas com as culturas de bactérias apresentaram sintomas de murchidão. Estes resultados induziram a teoria de que as culturas de bactérias produzem fitotoxinas⁷¹. Apesar destes resultados poderem sugerir que as bactérias induzem a DMP só por si, foi demonstrado por Zhao e colegas⁷² que plântulas suscetíveis inoculadas apenas com estirpes de bactérias isoladas de NMPs, provenientes de árvores com a DMP, não apresentaram sintomas de murchidão.

O conceito do potencial papel patogénico de bactérias na DMP conduziu a um grande número de estudos no sentido de desvendar as inter-relações entre os NMPs, as bactérias que transportam e a planta hospedeira. Zhao e colegas⁷² demonstraram que nemátodes estéreis, quando isolados de árvores onde foram previamente inoculados, permanecem livres de bactérias, suportando a teoria de que os NMPs não são os únicos agente patogénicos na DMP. Os autores sugeriram que ambos os nemátodes e as bactérias produtoras de toxinas são necessários para induzir a doença. Estes investigadores também estudaram e demonstraram a relação simbiótica mutualista entre os NMPs e as bactérias que transportam. Eles reportaram que o número de nemátodes isolados de pinheiros é maior quando são inoculados esterilmente com as bactérias patogénicas do que sem estas, concluindo que as bactérias promovem a reprodução dos nemátodes⁷². Por outro lado, demonstraram que o crescimento bacteriano é favorecido pela presença dos NMPs⁷³.

Vários estudos sobre a comunidade bacteriana associada aos NMPs têm sido desenvolvidos. Wang e colegas⁷⁴ observaram que o número médio de bactérias aderidas ao revestimento corporal de um nemátode isolado de uma árvore infetada é de 2.9×10^2 . Zhao e colaboradores⁷² estudaram a composição bacteriana transportada pelos NMPs

isolados de ambas árvores saudáveis e doentes, avaliando a capacidade dessas estirpes de bactérias em produzir fitotoxinas *in vitro*. Das 24 bactérias identificadas, 17 eram produtoras de fitotoxinas e 11 pertenciam ao gênero *Pseudomonas*⁷². Vários estudos posteriores identificaram bactérias associadas aos NMPs como pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*^{71,72,75}, *Pantoea*^{71,72,76} e *Enterobacter*^{75,76}.

O desenvolvimento de estudos relacionados com as bactérias aqui descritas também se debruçou sobre a elucidação de quais os compostos que podem estar associados às fitotoxinas produzidas por estas bactérias. Baseados na evidência que a extensiva morte celular e aumento da população de NMPs ocorrem na fase avançada da DMP, foi sugerido que os nemátodes poderiam metabolizar alguns compostos dos pinheiros em toxinas. Compostos químicos como o ácido benzóico e o catecol, os quais demonstraram uma efetiva atividade de fitotoxina por induzirem morte das células vegetais, foram isolados de pinheiros infetados com NMPs apenas depois da inoculação destes e respetiva infecção⁷⁷. Logo, foi sugerido que tais compostos químicos poderiam ser produzidos por nemátodes. Kawazu⁷⁸ demonstrou que o ácido fenilacético, que é potencialmente produzido por bactérias transportadas por NMPs, pode induzir a formação e acumulação de ácido benzoico. Assim, foi postulado que as reações do tecido da árvore ao ácido fenilacético podem ser importantes no mecanismo de parasitismo da DMP⁷⁸.

Mais recentemente, Guo e a sua equipa⁷⁹ identificaram uma flagelina de *P. fluorescens* em pinheiros e estudos posteriores evidenciaram que as flagelinas bacterianas podem estar envolvidas na libertação de hidratos de carbono e aminoácidos livres. Desta forma, estas proteínas podem induzir uma resposta imune na planta de resistência a patogêneos invasores, morte celular e diminuição do fluxo de água nas folhas, resultando em sintomas de murchidão⁶⁸.

Os dados aqui apresentados representam fortes evidências que justificam a hipótese na qual as bactérias transportadas por os NMPs podem ter um papel relevante no mecanismo da doença. No entanto, são necessários mais estudos para clarificar a associação dos nemátodes com as toxinas das respetivas bactérias na patogenicidade molecular do desenvolvimento da DMP⁶⁸.

2.3 Genes relacionados com a DMP

A grande maioria dos esforços científicos centrou-se na compreensão da relação entre os sintomas da DMP e a morte da árvore, com especial interesse na reação de defesa da planta à infecção dos NMPs. Adicionalmente, alguns aspetos relacionados com o NMP estão bem documentados, como a história, o ciclo de vida e a ecologia comportamental. No entanto, pouco se sabe sobre a base molecular da interação NMP-hospedeiro e o mecanismo molecular da DMP⁴⁴.

Um dos avanços que contribuiu para a importante evolução do conhecimento científico foi o rápido desenvolvimento das tecnologias de sequenciação de DNA, o que permitiu a evolução de projetos de marcadores de sequências expressas ou ESTs (expressed sequence tags) até aos métodos de sequenciação de transcritomas⁸⁰. Este último é baseado em tecnologias de sequenciação de próxima geração ou NGS (next-generation sequencing) e considera uma abordagem de sequenciação massiva paralela de pequenas sequências, enquanto o primeiro implica a clonagem de genes alvo e, posteriormente, sequenciação pelo método de Sanger⁸¹. A sequenciação de transcritomas tem tido uma grande importância no aumento do conhecimento sobre as adaptações dos nemátodes parasitas de plantas, a nível molecular. Especialmente, em relação às proteínas desses nemátodes, que permitem um parasitismo efetivo, e na compreensão de como essas proteínas interagem com a árvore hospedeira. Uma das aplicações mais notáveis da sequenciação de transcritomas foi a descoberta de genes que codificam proteínas cruciais no parasitismo das plantas, conhecidas como efetores, principalmente nos nemátodes formadores de cisto e os “root knot nematodes”⁴⁴. No entanto, poucos genes têm sido identificados em relação aos nemátodes endoparasitas migratórios, à exceção das enzimas degradadoras da parede celular de plantas, revelando a importância em identificar e estudar os genes envolvidos no parasitismo da DMP⁴².

2.3.1 Enzimas degradadoras da parede celular de plantas

As enzimas degradadoras da parede celular de plantas são o principal grupo de enzimas presentes em *B. xylophilus* e constituem um dos mais importantes grupos de efetores nos nemátodes parasitas de plantas²¹.

As celulasas são muito importantes para os parasitas de plantas porque a parede celular de células vegetais é a primeira barreira encontrada por estes parasitas. Kikuchi e

colaboradores⁸² identificaram um gene de uma glicosil hidrolase da família (GHF) 45, ou seja, uma β -1,4-endoglucanase em *B. xylophilus*, tendo depois clonado o gene e determinado a atividade da proteína resultante. O transcrito do gene foi detectado nas glândulas esofágicas e a presença da atividade enzimática nas secreções do NMP levaram os autores a sugerir que esta GHF45 é secretada a partir do estilete dos nemátodes. Posteriormente, Zhang e colaboradores⁸³ demonstraram que as β -1,4-endoglucanases estão localizadas não somente nas glândulas esofágicas mas também na ponta do estilete.

Em pinheiros infetados, as celulases foram identificadas, por fluorescência, perto das traqueídeos e nos canais de resina^{83,84}. Análises filogenéticas revelaram que as celulases GHF45 de *B. xylophilus* são mais similares às celulases de fungos do que de outros organismos, incluindo nemátodes como *Caenorhabditis elegans* e *Caenorhabditis briggsae* que têm o genoma completamente sequenciado e disponível à comunidade científica, e nos quais não estão presentes quaisquer genes codificantes de celulases GHF45. Alguns autores sugeriram que estas celulases de *B. xylophilus* terão sido adquiridas por HGT de fungos⁸², o que foi confirmado recentemente²¹. A sequenciação de genomas e transcritomas confirmou a presença extensiva de transcritos codificantes de celulases no NMP^{21,42}. Estudos prévios através de observações histológicas de tecidos vegetais sugeriram que as celulases são a causa da destruição das células em pinheiros⁴⁷.

O NMP experiencia uma grande gama de condições ao longo da sua migração nas árvores hospedeiras, o que promove a capacidade de produzir, adicionalmente às celulases, outras enzimas degradadoras da parede celular de plantas. Estas enzimas possuem diferentes atividades de forma a assegurar, eficazmente, os processos de alimentação e reprodução durante a invasão do hospedeiro.

Kikuchi e colaboradores⁸⁵ caracterizaram molecular e bioquimicamente uma β -1,3-endoglucanase de *B. xylophilus*. O transcrito codificante da proteína em estudo foi identificado num projeto de ESTs⁸⁶, sendo esta evidência, recentemente, confirmada através de sequenciação do transcritoma do NMP⁴². A caracterização bioquímica da proteína expressa demonstrou que as suas propriedades eram similares a uma β -1,3-endoglucanase da família GHF16⁸⁵, o que foi confirmado posteriormente por estudos filogenéticos a partir do EST (marcador de seqüências expressas) correspondente²¹. A seqüência de aminoácidos do transcrito apresentou um peptídeo sinal e a proteína localizou-se quer nas glândulas esofágicas como nas secreções do NMP, levando os

autores a sugerir que esta enzima é secretada pelos nemátodes através do estilete⁸⁵. Análises filogenéticas agrupam a sequência em aminoácidos desta proteína com glucanases de bactérias, suportando a conclusão que este gene foi adquirido por HGT a partir de bactérias⁸⁵.

É sugerido que o papel da β -1,3-endoglucanase no ciclo de vida do NMP está associado ao enfraquecimento das paredes celulares de fungos facilitando a alimentação do nemátode na forma micofágica, pois a β -1,3-endoglucana é um componente estrutural das paredes celulares de fungos. No entanto, uma β -1,3-endoglucanase foi recentemente encontrada em *Pratylenchus coffeae*, um nemátode que não é considerado micofágico⁸⁷. Uma sugestão considerada consiste na potencial ação desta enzima na degradação de calose, um polímero composto por β -1,3-endoglucano que é depositado por plantas em condições de stress⁸⁸.

As evidências de que em *B. xylophilus* o gene codificante de uma celulase foi adquirido de um fungo⁸² e o gene de uma β -1,3-endoglucanase de uma bactéria suportam a hipótese de que a HGT tenha ocorrido em ocasiões diferentes e de forma independente dentro do filo *Nematoda* e que tem contribuído para a evolução dos nemátodes no parasitismo de plantas⁸⁵.

Pectato liase é uma enzima geralmente utilizada pelos patógenos de plantas para degradar os substratos de pectina, que estão presentes na parede celular primária das células parenquimatosas e cambiais^{88,89}. Kikuchi e colaboradores⁸⁹ clonaram e caracterizaram genes codificantes de pectato liases de *B. xylophilus*. O estudo da sequência em aminoácidos do transcrito obtido por ESTs revelou que este pertence à família 3 de pectato liases de polissacarídeos presentes em fungos, bactérias e nemátodes. As propriedades bioquímicas da enzima expressa e correspondente ao transcrito identificado confirmaram a sua similaridade a pectato liases da família 3. A técnica de hibridização *in situ* demonstrou que o gene é expresso nas glândulas esofágicas do *B. xylophilus*. O conjunto destes resultados levou os autores a sugerir que esta enzima é secretada pelo estilete. O alinhamento das sequências referentes às pectato liases do *B. xylophilus* com outras sequências da mesma proteína de bactérias, fungos e nemátodes gerou uma árvore filogenética que demonstrou, claramente, que o gene não foi adquirido por HGT. Mais recentemente, a sequenciação do transcritoma⁴² e do genoma do NMP²¹ confirmaram a presença destes transcritos.

2.3.2 Expansina

Os NMPs também secretam proteínas como expansinas, que estão associadas à degradação/enfraquecimento das interações não covalentes entre os polissacarídeos que compõem a parede celular de plantas, facilitando a sua hidrólise pelas enzimas degradadoras da parede celular^{88,90}. Os transcritos que codificam expansinas foram identificados em análises de ESTs⁸⁶ de *B. xylophilus*, assim como, por abordagens de transcritômica⁴². A identificação direta pela sequenciação do genoma revelou a presença de genes codificantes de expansinas no NMP²¹. Através de modelações moleculares foi demonstrado que esses genes do NMP são estruturalmente similares a expansinas funcionalmente caracterizadas. Por hibridização *in situ* foi demonstrado que a expressão dos genes codificantes das expansinas está restrita às glândulas esofágicas. Assim, foi sugerido a potencial secreção destas proteínas através do estilete e a sua implicação na interação entre o nemátode e o hospedeiro, contribuindo na migração dentro da planta⁹⁰.

2.3.3 Proteínas alergénicas

Projetos de sequenciação do genoma total e do transcritoma têm identificado transcritos com grande semelhança a genes codificantes de determinadas proteínas alergénicas conhecidas como VAPs (venom allergen-protein) de outros nemátodes^{21,42}. Um dos projetos de ESTs, específico dos vários estágios de vida do NMP, identificou transcritos codificantes de VAPs e, por PCR (reação de polimerização em cadeia) em tempo real foi demonstrado um aumento da expressão dos respetivos genes no estágio JIV. Estes dados suportam a teoria de que estas proteínas podem estar potencialmente envolvidas na patogenicidade do *B. xylophilus*⁹¹. A acumulação exclusiva de transcritos codificantes de VAPs nas glândulas esofágicas e a sua deteção em volta destas glândulas, confirmaram a conclusão de que as VAPs são secretadas pelos NMPs e, conseqüentemente, o seu envolvimento no mecanismo de patogenicidade^{92,93}. A especificidade transcricional das VAPs na fase propagativa quando crescido em pinheiro face à mesma fase quando crescido em fungo confirmou que estas proteínas estão funcionais durante o parasitismo do NMP⁹³. Os autores também concluíram, por ensaios de RNA de interferência (RNAi) que as VAPs estão envolvidas na migração de *B. xylophilus*, possivelmente pela supressão do mecanismo de defesa dos pinheiros⁹³. No entanto, as suas funções específicas permanecem por elucidar⁹³.

2.3.4 Calreticulina

A calreticulina tem um papel efetivo nos nemátodes parasitas de plantas como *M. incognita*, considerando-se que pode estar envolvida em funções múltiplas como a exportação de proteínas, degradação do mRNA, adesão celular e regulação da homeostase de cálcio, potencialmente incidindo sobre determinadas vias de sinalização da planta⁹⁴. Li e colaboradores⁹⁵ clonaram e caracterizaram uma calreticulina de *B. xylophilus* por “southern blot” e a análise de ESTs revelou que o *B. xylophilus* contém pelo menos um gene codificante de calreticulina, o que é concordante com dados de projetos de ESTs obtidos recentemente⁴².

Evidências bioinformáticas demonstraram a potencial presença desta proteína nas secreções de NMPs⁴². Foi sugerida a importância da calreticulina no desenvolvimento do *B. xylophilus*⁴² de acordo com o potencial envolvimento desta proteína na oogénese em outros nemátodes⁹⁵. Esta conclusão baseou-se na análise semi-quantitativa da expressão do gene de calreticulina, por PCR em tempo real (RT-qPCR) nos 4 diferentes estágios de desenvolvimento do NMP. Esta análise demonstrou maior expressão do gene em nemátodes adultos e o silenciamento do gene por RNAi originou a diminuição da taxa de desenvolvimento do nemátode⁴².

2.3.5 Peroxirredoxina

A primeira linha de defesa em muitas plantas a nível molecular corresponde à respiração oxidativa na qual as espécies reativas de oxigénio ou ROS (reactive oxygen species) são geradas⁹⁶. A proteção do nemátode perante a defesa dos ROS gerados pelas plantas está relacionada com a produção de antioxidantes. Os antioxidantes de nemátodes como a superóxido dismutase, glutatona peroxidase e a peroxirredoxina têm sido descritos como efetores importantes na patogenicidade de nemátodes, mais especificamente na destoxificação de metabolitos tóxicos pertencentes à reação de defesa da planta⁴².

Li e colaboradores⁹⁷ clonaram uma peroxirredoxina de *B. xylophilus* com o objetivo de estudar o seu envolvimento na patogenicidade do NMP. Após a identificação do gene codificante da peroxirredoxina em *B. xylophilus*, a análise *in silico* da sua sequência e a análise estrutural da respetiva proteína revelou que esta correspondia a uma 2-cis peroxirredoxina, estando associada a uma classe específica de

peroxirredoxinas conservadas entre nemátodes. A análise da estrutura primária da proteína revelou que a sequência de aminoácido não continha um peptídeo sinal, no entanto, a sua distribuição celular foi localizada experimentalmente no citoplasma e no núcleo de células epidérmicas de cebola. Posteriormente, concluiu-se que a secreção deste antioxidante ocorre na região cuticular e pode estar associada à resposta adaptativa do nemátode, protegendo-o da reação de defesa do organismo hospedeiro⁹⁷. Estas conclusões foram suportadas pela abundante expressão desta proteína no NMP e sua localização maioritária na zona inferior da superfície cuticular e em células musculares, também, inferiores à superfície corporal⁹⁷.

2.3.6 Acetilcolinesterases

As acetilcolinesterases (AChE) desempenham um papel crucial na transmissão pós-sináptica na maioria dos animais e pelo menos quatro AChEs distintas foram descritas em nemátodes. Combinações diferentes de AChEs promovem a diversidade funcional destas proteínas, que podem ter um papel importante na patogenicidade dos nemátodes parasitas de plantas. Kang e colaboradores⁹⁸ avaliaram as funções fisiológicas destas proteínas no NMP e identificaram três AChEs distintas (AChE-1, AChE-2 e AChE-3). A análise das propriedades bioquímicas e cinéticas das enzimas revelaram que a AChE-1 e AChE-2 possuem funções sinápticas clássicas com uma compensação mutualista entre elas, enquanto a AChE-3 não está associada a estas funções neuronais⁹⁸. Estas propriedades peculiares da AChE-3 foram também reportadas em vários nemátodes parasitas de plantas⁹⁹.

Ensaio *in vitro* de inibição com compostos anti-AChE revelaram que a presença de AChE-3 em *B. xylophilus* reduz significativamente a inibição das outras AChEs, indicando a função protetora da atividade neuronal das AChE-1 AChE-2. Estas evidências suportaram a conclusão dos autores, na qual sugerem que a função da AChE-3 em *B. xylophilus* pode estar relacionada com a função de sequestração de xenobióticos, protegendo, assim, o sistema nervoso dos nemátodes face à toxicidade destes compostos. Estes resultados justificaram o estudo da sensibilidade do *B. xylophilus* a diversos compostos nematicidas, por silenciamento do gene codificante da AChE-3. Os resultados revelaram que o seu silenciamento aumenta a mortalidade dos nemátodes, demonstrando a importância desta proteína da destoxificação de xenobióticos. Ensaio de inibição utilizando inibidores de AChEs presentes na resina de

pinheiro, como o α -pineno e o limoneno, demonstraram que ambos os nematicidas inibem a atividade do AChE-3, mas não foram observados eventos de inibição na AChE-2 e apenas o α -pineno inibiu a AChE-1. Estes resultados indicam que a AChE-3 do NMP provavelmente interage com toxinas secundárias da planta, protegendo a função pós-sináptica das restantes AChEs¹⁰⁰.

2.3.7 Projeto de sequenciação do genoma do *B. xylophilus*

Recentemente, Kikuchi e colaboradores²¹ publicaram o genoma (versão ainda não completa) do *B. xylophilus*, o qual representa uma ferramenta importante para o estudo da evolução e do mecanismo de parasitismo do NMP. Os resultados gerados indicaram que o genoma é constituído por 6 pares de cromossomas, tal como o de *C. elegans*, evidenciando as similaridades partilhadas entre os dois nemátodes. Os autores previram mais de 18 mil genes codificantes de proteínas, no entanto os resultados completos da respetiva anotação não foram ainda publicados. As potenciais proteínas anotadas, como enzimas degradadoras da parede celular de plantas, que foram discutidas anteriormente, estão presentes na Tabela 1. Glicosil hidrolases como GHF5, xilanasas da GHF30, arabinases da GHF43 e pectinases da GHF28 não foram detetadas no genoma. As proteínas degradadoras da parede celular de plantas identificadas em *B. xylophilus* constituem uma bateria de genes única quando comparadas com os outros nemátodes. Verificou-se, também, que as famílias de peptidases envolvidas na digestão extracelular e atividades lisossomais foram expandidas no NMP, sendo as mais importantes referidas na tabela 1²¹.

Kikuchi e colaboradores²¹ investigaram a presença em *B. xylophilus* de efetores de espécies de nemátodes parasitas de plantas bem estudadas, como *Meloidogyne incognita*, *Heterodera glycines* e *Globodera pallida*, estando a maioria ausentes. Os efetores identificados estão apresentados na Tabela 1. A ausência destes efetores conhecidos em *B. xylophilus* e a presença de um conjunto específico de genes codificantes de enzimas degradadoras da parede celular de plantas, suportam a teoria de que o parasitismo deste nemátode teve uma origem independente em relação aos outros nemátodes parasitas de plantas e, conseqüentemente, um mecanismo molecular de patogenicidade distinto²¹. Os genes identificados no NMP potencialmente associados à utilização de metabolitos do hospedeiro e neuropéptidos também estão evidenciados na Tabela 1.

Tabela 1 – Efeitores putativos conhecidos de maior importância em *B. xylophilus*. A tabela inclui a categoria, função putativa no mecanismo de patogenicidade do NMP, validação da identificação do gene em *B. xylophilus*, referência do estudo onde o gene foi identificado e observações importantes. GST: Glutathione-S-transferase; UGT: Uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferase; SDR: Desidrogenase/reductase de cadeia curta; ABC: Cassetes de ligação de ATP ou ATP-binding cassette, Lep d: *Lepidoglyphus destructor*, ASM: Ácido esfingomielinase, flp: Péptido tipo de FMRF, nlp: Proteína tipo de neuropéptido, ins: Proteína tipo de insulina, ROS: Espécies reativas de oxigênio

Efeitor	Categoria/função (putativa)	Identificação experimental	Ref.	Observações
Família de Citocromo P450	<ul style="list-style-type: none"> • Destoxificação de xenobióticos 	Sim por RT-qPCR ⁴²	21,42	<ul style="list-style-type: none"> • Conhecido efetor de nemátodes parasitas de plantas⁸⁸
Família de GST	<ul style="list-style-type: none"> • Destoxificação de ROS • Destoxificação de xenobióticos • Destoxificação de ROS 	Sim por RT-qPCR ⁴²	21,42	<ul style="list-style-type: none"> • Conhecido efetor de nemátodes parasitas de plantas⁸⁸
Família de UGT	<ul style="list-style-type: none"> • Destoxificação de xenobióticos 	Sim por RT-qPCR ⁴²	21,91	<ul style="list-style-type: none"> • Específico do estágio propagativo crescido em planta⁹¹ • Conhecido efetor de nemátodes parasitas de plantas⁸⁸
Família de SDR	<ul style="list-style-type: none"> • Destoxificação de xenobióticos 	Sim por RT-qPCR ⁴²	21,42	<ul style="list-style-type: none"> • Conhecido efetor de nemátodes parasitas de plantas⁸⁸
Transportador ABC	<ul style="list-style-type: none"> • Destoxificação de xenobióticos 	Sim por RT-qPCR ⁴²	21,42	<ul style="list-style-type: none"> • Conhecido efetor de nemátodes parasitas de plantas⁸⁸
Peptidase de ácido aspártico	<ul style="list-style-type: none"> • Destoxificação de xenobióticos • Digestão extracelular 	Não	21	<ul style="list-style-type: none"> • Adquirido por HGT a partir de fungo²¹ • Conhecido efetor de nemátodes parasitas de plantas⁸⁸
Metalopeptidase	<ul style="list-style-type: none"> • Destoxificação de xenobióticos • Digestão extracelular 	Não	21	<ul style="list-style-type: none"> • Conhecido efetor de nemátodes parasitas de plantas⁸⁸
Peptidase de serina	<ul style="list-style-type: none"> • Destoxificação de xenobióticos • Digestão extracelular 	Não	21	
Peptidase de treonina	<ul style="list-style-type: none"> • Destoxificação de xenobióticos • Digestão extracelular 	Não	21	
Fator de transcrição SKN-1	<ul style="list-style-type: none"> • Regulação da destoxificação de xenobióticos 	Não	21	
Epóxido hidrolase 1	<ul style="list-style-type: none"> • Destoxificação de xenobióticos 	Sim por RT-qPCR	91	<ul style="list-style-type: none"> • Específico do estágio “dauer”⁹¹
Proteína hipotética CBG23351	<ul style="list-style-type: none"> • Destoxificação de xenobióticos 	Sim por RT-qPCR	91	<ul style="list-style-type: none"> • Específico do estágio propagativo crescido em planta⁹¹
Peptidase de cisteína	<ul style="list-style-type: none"> • Destoxificação de xenobióticos • Digestão extracelular 	Sim por RT-qPCR	91	<ul style="list-style-type: none"> • Específico do estágio propagativo crescido em planta⁹¹ • Conhecido efetor de nemátodes parasitas de plantas⁸⁸
Alergénico Lep d 1.02	<ul style="list-style-type: none"> • Destoxificação de xenobióticos 	Sim por RT-qPCR	91	<ul style="list-style-type: none"> • Específico do estágio propagativo crescido em planta⁹¹
Proteína extracelular tipo de SCP	<ul style="list-style-type: none"> • Destoxificação de xenobióticos 	Sim por RT-qPCR	91	<ul style="list-style-type: none"> • Específico do estágio propagativo crescido em planta⁹¹

Tabela 1 - Efeitores putativos conhecidos de maior importância em *B. xylophilus*. A tabela inclui a categoria, função putativa no mecanismo de patogenicidade do NMP, validação da identificação do gene em *B. xylophilus*, referência do estudo onde o gene foi identificado e observações importantes. GST: Glutathione-S-transferase; UGT: Uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferase; SDR: Desidrogenase/reductase de cadeia curta; ABC: Cassetes de ligação de ATP ou ATP-binding cassette, Lep d: *Lepidoglyphus destructor*, ASM: Ácido esfingomielinase, flp: Péptido tipo de FMRF, nlp: Proteína tipo de neuropéptido, ins: Proteína tipo de insulina, ROS: Espécies reativas de oxigênio. (Continuação)

Efeitor	Categoria/função (putativa)	Identificação experimental	Ref.	Observações
GH109	<ul style="list-style-type: none"> Enzima de destoxificação 	Não	21,42	<ul style="list-style-type: none"> Atividade de Trans1,2-dihidrobenceno-1,2-diol dehidrogenase²¹
Glutathione peroxidase	<ul style="list-style-type: none"> Destoxificação de ROS 	Não	86	<ul style="list-style-type: none"> Conhecido efetor de nemátodes parasitas de plantas⁸⁸
Superóxido dismutase	<ul style="list-style-type: none"> Destoxificação de ROS 	Não	86	<ul style="list-style-type: none"> Conhecido efetor de nemátodes parasitas de plantas⁸⁸
Catalase	<ul style="list-style-type: none"> Destoxificação de ROS 	Não	86	<ul style="list-style-type: none"> Conhecido efetor de nemátodes parasitas de plantas⁸⁸
Família 1 de ASM	<ul style="list-style-type: none"> Resposta ao stress 	Sim por RT-qPCR	91	<ul style="list-style-type: none"> Específico do estágio “dauer”⁹¹
Proteína e choque térmico 16.1	<ul style="list-style-type: none"> Resposta a estímulos 	Sim por RT-qPCR	91	<ul style="list-style-type: none"> Específico do estágio “dauer”⁹¹
Δ6-dessaturase	<ul style="list-style-type: none"> Resposta a estímulos 	Sim por RT-qPCR	91	<ul style="list-style-type: none"> Específico do estágio propagativo crescido em planta⁹¹
Proteína tipo de 14-3-3	<ul style="list-style-type: none"> Atuação sobre específicas vias de sinalização da planta 	Não	42	<ul style="list-style-type: none"> Conhecido efetor de nemátodes parasitas de plantas⁸⁸
Galectina	<ul style="list-style-type: none"> Proteção contra infeções microbianas 	Não	42	<ul style="list-style-type: none"> Conhecido efetor de nemátodes parasitas de plantas⁸⁸
Lisozima	<ul style="list-style-type: none"> Proteção contra infeções microbianas 	Não	42	
Cistatina ou inibidor da peptidase cisteína	<ul style="list-style-type: none"> Fator de patogenicidade imunomodulatório 	Não	21	<ul style="list-style-type: none"> Adquirido por HGT de bactéria²¹ Conhecido efetor de nemátodes parasitas de plantas⁸⁸
Quitinase (GHF 18, 19 e 20)	<ul style="list-style-type: none"> Degradação da parede celular de fungos ou eclosão de ovos 	Não	21,86	
Proteínas tipo de transtiretina	<ul style="list-style-type: none"> Regulação do crescimento 	Sim por RT-qPCR ⁹¹	42,91	<ul style="list-style-type: none"> Específico do estágio “dauer”⁹¹ Conhecido efetor de nemátodes parasitas de plantas⁸⁸
Família de sorbitol desidrogenase	<ul style="list-style-type: none"> Produção de energia 	Sim por RT-qPCR	91	<ul style="list-style-type: none"> Específico do estágio “dauer”⁹¹
Glicerofosforil diéster fosfodiesterase flp	<ul style="list-style-type: none"> Transmissão e formação do estágio “dauer” 	Sim por RT-qPCR	91	<ul style="list-style-type: none"> Específico do estágio “dauer”⁹¹ Alvo para controlo do nemátode²¹
	<ul style="list-style-type: none"> Neuropéptido 	Sim por RT-qPCR ⁹¹	21,91	<ul style="list-style-type: none"> Específico do estágio “dauer”⁹¹ Alvo para controlo do nemátode²¹
nlp	<ul style="list-style-type: none"> Neuropéptido 	Não	21	<ul style="list-style-type: none"> Alvo para controlo do nemátode²¹
ins	<ul style="list-style-type: none"> Neuropéptido 	Não	21	<ul style="list-style-type: none"> Alvo para controlo do nemátode²¹

Apenas um conjunto específico de efetores têm sido extensivamente estudados, suportando a maioria da informação conhecida sobre o mecanismo molecular da DMP e o seu desenvolvimento. Apesar dos potenciais efetores aqui descritos e discutidos, são necessárias futuros estudos de forma a revelar a sua relevância biológica considerando todo o panorama da doença. Estes estudos sobre os genes potencialmente relacionados com a patogenicidade do *B. xylophilus* irão certamente fornecer importantes evidências para a compreensão do mecanismo envolvidos na patogenicidade e adaptação deste nemátode endoparasita migratório de plantas⁴².

3. Abordagens de elucidação do mecanismo molecular da DMP

O mecanismo molecular da DMP está longe de ser completamente compreendido. Inicialmente, os estudos focaram-se sobre os sintomas histológicos associados à infecção da árvore e a sua associação com a progressão do estado de murchidão até à morte da árvore. Mais recentemente, com o repentino aumento da qualidade e quantidade de tecnologias de investigação encarou-se uma mudança na perspectiva dos objetivos a alcançar para, um nível molecular.

A investigação molecular associada à DMP tem como principal objetivo alcançar um nível de conhecimento no qual é possível compreender quais as moléculas do NMP que interagem com a planta hospedeira, induzindo um desequilíbrio na homeostase desta. Adicionalmente, também as moléculas que permitem a proteção do nemátode fase às estratégias de ataque e defesa da planta são alvos de pesquisa importantes.

A abordagem de sequenciação do genoma completo fornece a mais abundante das informações sobre a constituição de um organismo, mas o processo é caro e demora relativamente muito tempo¹⁰¹. Apesar disso, o genoma é apenas uma fonte de informação, no qual não temos conhecimento concreto da atividade/função dessa informação. A função de um genoma é fornecida pela expressão génica, a qual é num nível primário, correspondente à transcrição dos genes. Assim, o significado funcional de um organismo é primariamente suportado pelo seu transcrito, constituindo, assim,

a transcritômica como uma abordagem alternativa menos intensiva a nível de recursos, em comparação à sequenciação do genoma total.

3.1 Transcritômica

A compreensão do transcrito é essencial para a interpretação dos elementos funcionais de um genoma e para a revelação dos constituintes moleculares específicos de células e tecidos. De forma generalizada, a análise do transcrito total de um organismo individual fornece uma visão global dos seus padrões de expressão gênica em condições fisiológicas específicas. Os objetivos principais da transcritômica são: catalogar todas as espécies de transcritos, em que o mRNA assume uma posição privilegiada porque oferece informação significativa em relação à expressão gênica e funções do genoma; determinar a estrutura transcricional dos genes como o local de iniciação, extremidade 5' e 3', padrões de splicing e outras modificações pós-traducionais; e avaliar/quantificar diferentes padrões de expressão gênica numa abordagem comparativa⁸⁰.

Diversas tecnologias têm sido desenvolvidas para caracterizar e quantificar o transcrito, incluindo abordagens baseadas na sequência ou por técnicas de hibridização. Ao contrário das técnicas baseadas em hibridização como os microarray, as abordagens baseadas nas sequências determinam a sequência de cDNA diretamente. Inicialmente, técnicas como microarray e PCR em tempo real foram utilizadas para medir a expressão de mRNAs. No entanto, problemas associados ao custo e sensibilidade promoveram a emergência de abordagens baseadas em técnicas de NGS⁸¹.

3.1.1. Tecnologias NGS

A sequenciação de DNA fornece uma importante plataforma para a investigação biológica molecular, especialmente depois da sequenciação do primeiro genoma humano. A importância destas tecnologias na pesquisa e diagnósticos aumentou de forma significativa, induzindo o desenvolvimento de métodos potentes de NGS¹⁰². A revolução da NGS permitiu a diminuição extrema dos custos associados à sequenciação de DNA e o tempo requerido nos respetivos procedimentos. Adicionalmente, estes novos métodos aumentaram a resolução das tecnologias à precisão de uma única base

nucleotídica⁸¹. As aplicações e as potencialidades da NGS são imensas, estando algumas apresentadas na Figura 6.

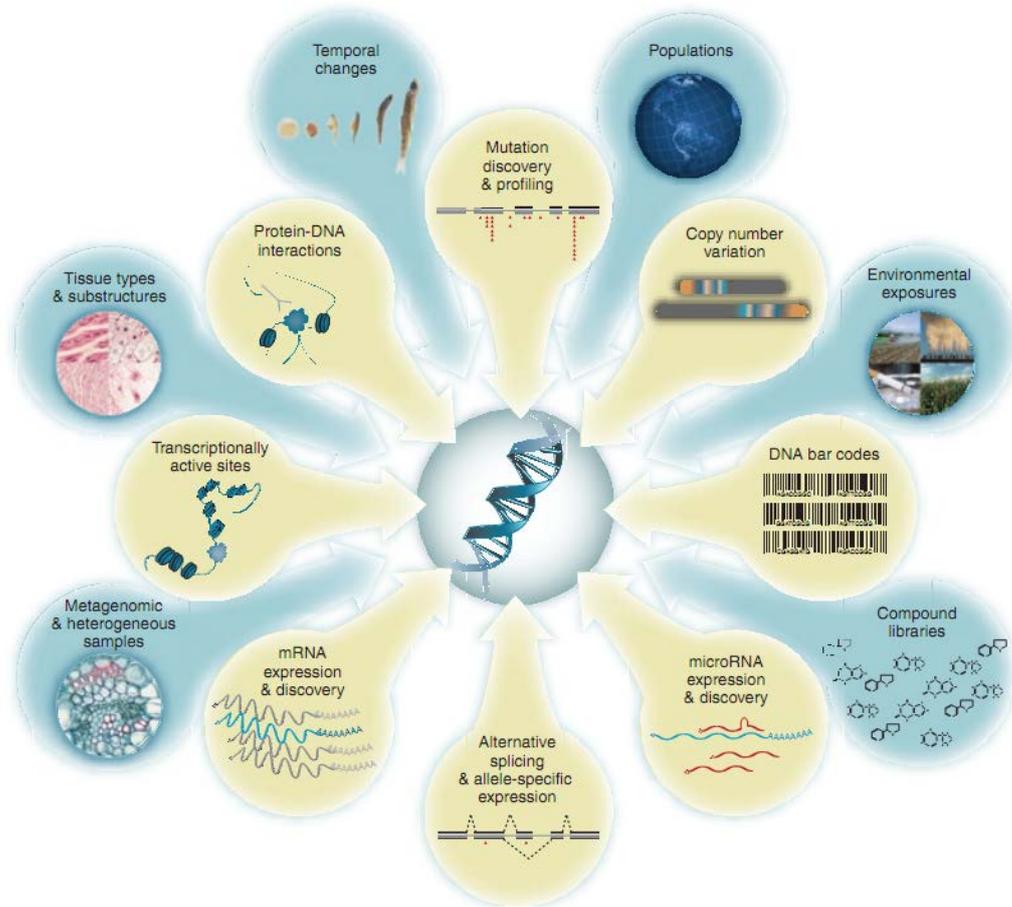


Figura 6 – Aplicações das tecnologias de sequenciação de próxima geração. Adaptado de ¹⁰³.

As tecnologias de sequenciação de DNA têm evoluído desde a sua invenção na década de 70 por Maxam-Gilbert¹⁰⁴ e Sanger¹⁰⁵, aumentando exponencialmente as potencialidades na área da genética. A tecnologia de Sanger¹⁰⁵ é a mais frequentemente utilizada para a sequenciação de vários genomas, incluindo o humano¹⁰², e baseia-se numa técnica de sequenciação por síntese. Os princípios desta técnica permanecem atualmente e suportam algumas tecnologias de NGS.

A maioria das tecnologias de NGS baseia-se numa técnica de sequenciação por síntese como o caso do 454 Genome Sequencer (GS) FLX da Roche ou o HiSeq da Illumina. Recentemente, emergiu uma nova técnica de sequenciação que consiste na sequenciação por ligação, como o sequenciador SOLIDTM ¹⁰⁶ da Applied Biosystems.

A tecnologia de sequenciação “454” é o método NGS mais utilizado em estudos de transcritômica⁸¹. Este sequenciador de próxima geração utiliza uma tecnologia de sequenciação evoluída da de Sanger, conhecida como pirosequenciação. A título de exemplo, Vera e colaboradores apresentaram a montagem *de novo* do transcritoma de uma eucariota utilizando a tecnologia pirosequenciação 454¹⁰⁷.

3.2 Transcritômica comparativa

A evolução das tecnologias de sequenciação de DNA promoveram o aumento do número de genomas e transcritomas sequenciados. Por sua vez, a enorme quantidade de informação genética disponível nas várias bases de dados existentes permitem o desenvolvimento de estudos baseados em abordagens comparativas. Estas abordagens não se baseiam somente em organismos modelo com o genoma sequenciado, mas também na análise/abordagem comparativa, na qual é selecionado um organismo de comparação de acordo com o objetivo do trabalho¹⁰⁸.

B. mucronatus representa um organismo interessante numa ótica comparativa para o estudo da DMP e o seu mecanismo de patogenicidade.

3.2.1 *B. mucronatus* como nemátode de comparação na pesquisa sobre a DMP, através da abordagem de transcritômica comparativa

B. mucronatus é o nemátode mais próximo filogeneticamente de *B. xylophilus* e não é um agente patogéneo efetivo na DMP. As diferenças entre os dois nemátodes têm sido investigadas de forma a inferir quais as diferenças que originam tão distintas consequências aquando da sua invasão em árvores suscetíveis. Esta relação filogenética próxima é crucial no âmbito de uma abordagem de transcritômica comparativa pois a variabilidade genética pequena existente entre os dois organismos em comparação poderá codificar a ação diferente que ambos estabelecem com a árvore hospedeira.

Adicionalmente, a relação filogenética próxima entre os dois organismos é crucial na abordagem de transcritômica comparativa pois a sua variabilidade genética pequena poderá codificar a variabilidade da sua ação para com a árvore hospedeira.

Assim, *B. mucronatus* constitui uma excelente seleção para a análise comparativa a nível transcritômico.

3.2.1.1 Patogenicidade de *B. mucronatus*

Existem muitas evidências de vários estudos demonstrando que *B. mucronatus* não é um agente patogénico no desenvolvimento da DMP, apesar da próxima relação filogenética com o principal agente etiológico da doença, *B. xylophilus*.

Fukuda⁴⁵ em 1997 hipotetizou que os isolados avirulentos do NMP, incluindo *B. mucronatus*, quando inoculados em plântulas suscetíveis, não causavam o desenvolvimento da doença. Considerando o padrão sintomatológico da DMP, é considerado que o *B. mucronatus* induz efeitos similares na árvore hospedeira até ao ponto crítico de evolução da doença, no qual a doença progride ou não para a sua fase avançada⁴⁵. Assim, foi sugerido que o desenvolvimento de sintomas observado em árvores infetadas com este *Bursaphelenchus* não patogénico cessa após o primeiro evento de embolismo.

Fukuda e a sua equipa¹⁰⁹ investigaram o desenvolvimento da DMP em árvores suscetíveis inoculadas com isolados virulentos do NMP ou *B. mucronatus* em condições similares. Os autores concluíram que o *B. mucronatus* apenas causa a disfunção de áreas restritas de traqueídeos justificando a ausência de sintomas externos como a alteração fisiológicas nas folhas¹⁰⁹. Também foi observado que a disfunção na condução da água ocorria por influência de substâncias voláteis e nenhum evento associado aos poros das traqueídeos foi registado, confirmando a ocorrência apenas do primeiro evento de embolismo. Este resultado foi congruente com a observação de que a distribuição da população de *B. mucronatus* foi restrita ao local de inoculação causando cavitação apenas no xilema interno, estando este associado somente ao primeiro evento de cavitação. Os autores sugeriram que esta área de cavitação confinada deve-se à capacidade diferente das duas espécies de nemátodes em invadir os tecidos cambiais, na qual os isolados virulentos do NMP demonstraram maior habilidade. Desta forma, concluiu-se que esta capacidade distinta pode justificar as diferenças na patogenicidade dos dois nemátodes¹⁰⁹. Ishida e colegas⁶⁷ demonstraram que um maior número de NMPs consegue invadir feridas induzidas em ramos de árvores suscetíveis, em comparação com *B. mucronatus*. Assim, os autores concluíram que os isolados virulentos do NMP têm maior habilidade em invadir o córtex⁶⁷, o que é consistente com

dados reportados por Fukuda e a sua equipa de investigação¹⁰⁹, revelando a menor capacidade dos nemátodes não patogénicos em invadir os tecidos da planta.

Várias diferenças a nível dos sintomas internos da árvore hospedeira, aquando da inoculação com *B. mucronatus* ou isolados virulentos de NMP, têm sido reportados. Uma das mais importantes é o facto de árvores suscetíveis quando inoculadas com *B. mucronatus* não apresentarem o padrão de modificações citológicas das células parenquimatosas associado à DMP, como a acumulação de taninos, alargamento dos vacúolos e o desaparecimento de lípidos. Foi, assim, sugerido que a reação de defesa da árvore face à infeção de espécies não patogénicas é diferente⁵⁷.

Todas estas evidências revelam a especificidade do mecanismo de patogenicidade da DMP e a sua estrita relação com *B. xylophilus*.

3.2.1.2 Efeitos de parasitismo em *B. mucronatus*

Evidências reportadas em muitos estudos relacionadas com o papel patogénico de *B. mucronatus* na DMP sugerem a existência, a nível molecular, de interações diferentes estabelecidas entre *B. mucronatus* e *B. xylophilus* com árvores suscetíveis^{42,110}. Estas evidências surgiram de estudos a nível dos sintomas e da morte fisiológica da árvore, promovendo o pouco conhecimento existente sobre as interações, a nível molecular, que desencadeiam estes sintomas. Os estudos genéticos têm-se demonstrado uma abordagem interessante na obtenção de conhecimento sobre as diferenças entre os dois nemátodes que originam as diferentes interações com as árvores hospedeiras^{90,111}.

Comparativamente com estudos baseados na identificação de genes do NMP, um número reduzido de estudos foram desenvolvidos no âmbito do *B. mucronatus*. Os efeitos de patogenicidade potencialmente presentes em *B. mucronatus* estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Genes codificantes de potenciais efetores detetados por EST e RNA-Seq em *B. mucronatus*. A tabela inclui a categoria e a função putativa do efector no mecanismo de parasitismo do NMP, a respectiva referência onde o efector putativo foi identificado e observações importantes. É relevante referir que apenas os genes codificantes de VAPS foram experimentalmente validados em *B. mucronatus*, no entanto a sua potencial ação na patogenicidade do NMP permanece desconhecida. VAP: *Venom allergen protein*, GST: Glutathione-S-transferase; UGT: Uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferase; SDR: Desidrogenase/reductase de cadeia curta; ABC: Cassetes de ligação de ATP ou ATP-binding cassette, ROS: Espécies reativas de oxigénio

Efector	Categoria/função (putativa)	Ref.	Observações
VAPs	<ul style="list-style-type: none"> • Supressão do mecanismo de defesa da árvore 	42	<ul style="list-style-type: none"> • Conhecido efector de nemátodes parasitas de plantas⁸⁸
Celulase (B-1,4-endoglucanase)	<ul style="list-style-type: none"> • Degradação da parede celular de plantas 	42	<ul style="list-style-type: none"> • Conhecido efector de nemátodes parasitas de plantas⁸⁸
B-1,3-endoglucanase	<ul style="list-style-type: none"> • Degradação da parede celular de plantas 	42	<ul style="list-style-type: none"> • Conhecido efector de nemátodes parasitas de plantas⁸⁸
Pectato liase	<ul style="list-style-type: none"> • Degradação da parede celular de plantas 	42	<ul style="list-style-type: none"> • Conhecido efector de nemátodes parasitas de plantas⁸⁸
Galectina	<ul style="list-style-type: none"> • Proteção contra infeções microbianas 	42	<ul style="list-style-type: none"> • Conhecido efector de nemátodes parasitas de plantas⁸⁸
Lisozima	<ul style="list-style-type: none"> • Proteção contra infeções microbianas 	42	
Quitinase	<ul style="list-style-type: none"> • Degradação da parede celular de fungos ou eclosão de ovos 	21,42,86	
Proteínas de tipo transtiretina	<ul style="list-style-type: none"> • Regulação do desenvolvimento 	42	<ul style="list-style-type: none"> • Conhecido efector de nemátodes parasitas de plantas⁸⁸
Calreticulina	<ul style="list-style-type: none"> • Atuação sobre específicas vias de sinalização da planta 	42	<ul style="list-style-type: none"> • Conhecido efector de nemátodes parasitas de plantas⁸⁸
Proteína tipo de 14-3-3	<ul style="list-style-type: none"> • Atuação sobre específicas vias de sinalização da planta 	42	<ul style="list-style-type: none"> • Conhecido efector de nemátodes parasitas de plantas⁸⁸
Família de Citocromo P450	<ul style="list-style-type: none"> • Destoxificação de xenobióticos • Destoxificação de ROS 	42	<ul style="list-style-type: none"> • Conhecido efector de nemátodes parasitas de plantas⁸⁸
Família de GST	<ul style="list-style-type: none"> • Destoxificação de xenobióticos • Destoxificação de ROS 	42	<ul style="list-style-type: none"> • Conhecido efector de nemátodes parasitas de plantas⁸⁸
Família de UGT	<ul style="list-style-type: none"> • Destoxificação de xenobióticos 	42	<ul style="list-style-type: none"> • Conhecido efector de nemátodes parasitas de plantas⁸⁸
Família de SDR	<ul style="list-style-type: none"> • Destoxificação de xenobióticos 	42	<ul style="list-style-type: none"> • Conhecido efector de nemátodes parasitas de plantas⁸⁸
Transportador ABC	<ul style="list-style-type: none"> • Destoxificação de xenobióticos 	42	<ul style="list-style-type: none"> • Conhecido efector de nemátodes parasitas de plantas⁸⁸

4 Abordagens e objetivos do projeto

A doença da murchidão do pinheiro representa uma das mais perigosas ameaças para ecossistemas em todo o mundo. Apesar dos esforços da comunidade científica, o mecanismo molecular da patogenicidade de *B. xylophilus* permanece por elucidar.

Os objetivos principais deste trabalho são a elucidação do mecanismo molecular da DMP e a descoberta de marcadores de patogenicidade em *B. xylophilus*. Estes objetivos encaixam na importante necessidade de compreender como o NMP, a um nível molecular, parasita as árvores de pinheiro suscetíveis e induz a sua morte, ultrapassando os seus mecanismos de defesa. Assim, a abordagem de transcritômica e as suas potencialidades enquadram-se nos objetivos propostos para este estudo. A sequenciação dos transcritomas pelo 454 GS FLX da Roche produzirá os dados necessários para aplicar as ferramentas de transcritômica comparativa de acordo com os objetivos propostos na Figura 7.

O esquema apresentado na Figura 7 inclui as amostras iniciais como objeto de estudo e como a informação da sequenciação destas amostras constitui uma plataforma para diversas abordagens de transcritômica comparativa. Os dados da sequenciação dos transcritomas são organizados de forma a elucidarem os objetivos propostos. A análise comparativa dos transcritomas permite a deteção/descoberta de genes que são exclusivamente expressos ou sobreexpressos num ou em vários dos transcritomas em comparação. Assim, na primeira abordagem de transcritômica comparativa comparamos o transcritoma de *B. xylophilus* com o de *B. mucronatus* de forma a obter evidências no transcritoma da espécie patogénica. Na segunda abordagem comparamos os transcritomas dos três tipos de vida de *B. xylophilus* crescido em pinheiro (machos, fêmeas e JIII) com o intuito de encontrar genes importantes em cada um desses tipos de vida que permitam a reprodução e o desenvolvimento do nemátode dentro da árvore. A terceira abordagem visa a deteção/descoberta de genes que se destaquem em *B. xylophilus* crescido em pinheiro face à mesma espécie crescida em fungo. Por fim, a última abordagem representa um estudo adicional, no qual se pretende analisar genes com destaque em *B. xylophilus* crescido em pinheiro em comparação com o *B. mucronatus* crescido em fungo. Os resultados gerados nas 4 abordagens serão integrados de forma a permitir a identificação de genes potencialmente envolvidos no mecanismo de patogenicidade do *B. xylophilus*. Os resultados na terceira abordagem

poderão, adicionalmente, permitir a obtenção de informações interessantes relacionadas com a potencialidade de mimetizar as interações entre o nemátode e a planta em populações do nemátode crescidas em fungo. Um exemplo deste interesse pode consistir no estudo da resposta dos NMPs face a terpenos, que são pulverizados na cultura em crescimento sob condições laboratoriais controladas.

Em todos os ensaios evidenciados na Figura 7, a interpretação dos resultados é baseada na deteção de genes que são específicos de um dos transcritomas em comparação. Esta especificidade é inferida pela representação dos genes entre os transcritomas em comparação, sendo, posteriormente, pela análise dos resultados, identificados os genes com potencialidade de estarem envolvidos no parasitismo. Em última instância, a validação da expressão génica por PCR em tempo real irá assegurar os resultados obtidos *in silico*.

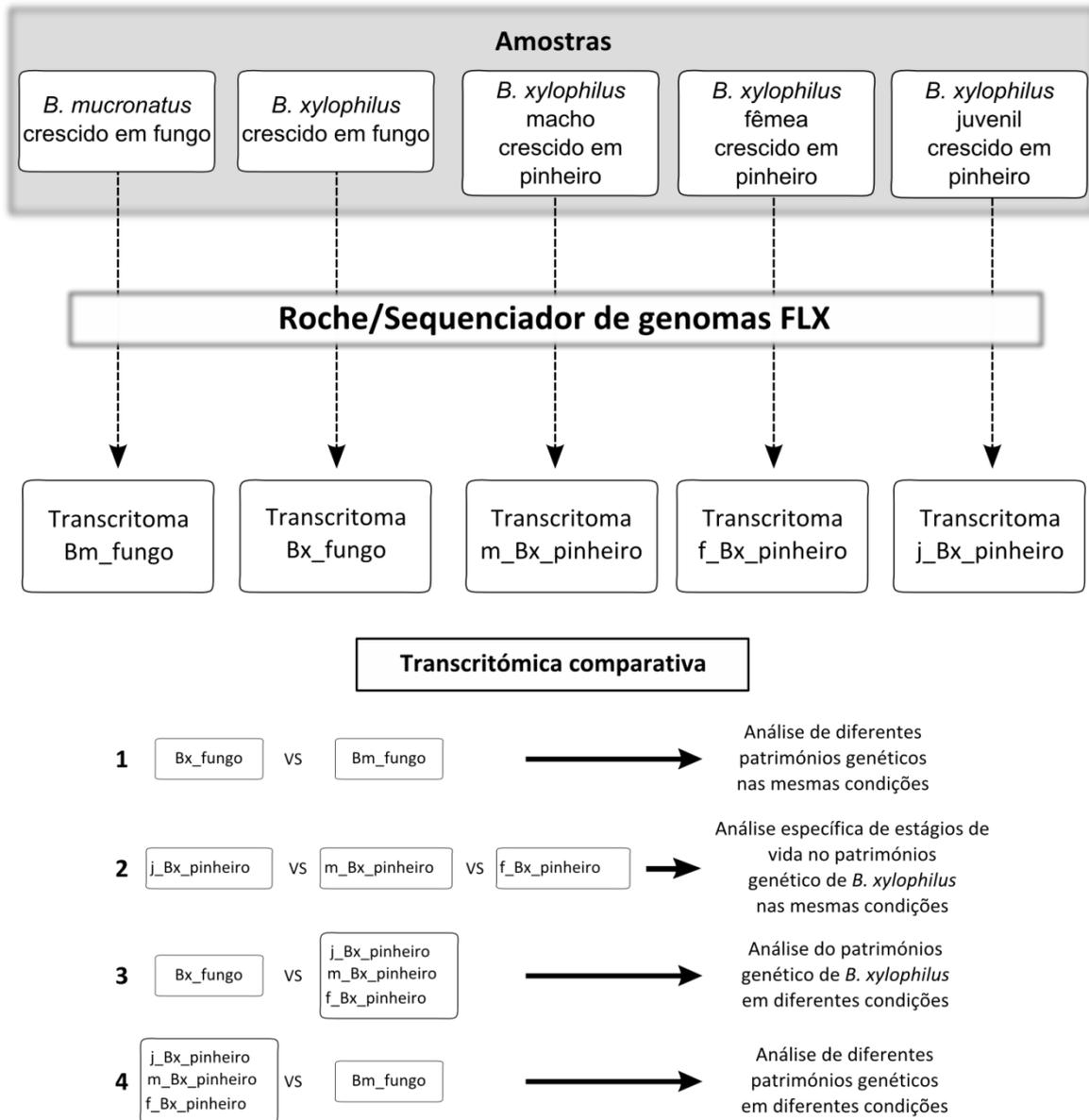


Figura 7 - Esquema representativo da relação entre os objetivos do estudo e as abordagens utilizadas no seu desenvolvimento. As amostras de nemátodes selecionadas para este estudo visam a deteção de marcadores de patogenicidade em *B. xylophilus*. Estas amostras foram estudadas e integradas comparativamente de forma a elaborar diferentes abordagens de transcritômica comparativa, permitindo a análise do problema biológico da DMP sob diferentes perspetivas.

Materiais e métodos

1. Materiais biológicos

1.1 Cultura dos nemátodes

Os nemátodes utilizados neste estudo correspondem ao isolado geográfico 17 de *B. xylophilus* proveniente de Alcácer do Sal (BxPt17AS) e ao isolado geográfico 2 de *B. mucronatus* (BmPt2). Os nemátodes foram crescidos e mantidos em culturas de *Botrytis cinerea* Pars., em meio de agar com extrato de malte e incubados a 25°C. Ambos os isolados pertencem à coleção de isolados do grupo de investigação da Dra. Isabel Abrantes no Instituto de Investigação Marinha (IMAR), e foram crescidos e mantidos por este grupo.

1.2 Inoculação dos nemátodes em pinheiros e a sua recuperação

O isolado BxPt17AS foi inoculado em *P. pinaster*, com 4/5 anos de idade. Para tal, foram preparadas suspensões de aproximadamente 6000 nemátodes em 0.5 mL de água destilada.

A inoculação foi feita no tronco, a cerca de 10 cm abaixo dos ramos mais baixos. A casca da árvore foi cuidadosamente retirada e recorrendo a um bisturi realizou-se um corte do tipo meio T. Uma fração de algodão estéril foi molhada com água destilada esterilizada e inserida em volta do corte. De seguida a suspensão de nemátodes (0.5 mL) foi lentamente aplicada dentro do corte com recurso a uma pipeta. No final o ponto de inoculação foi fechado com uma tira de parafilm¹¹².

As árvores inoculadas foram mantidas sob condições de estufa (25-30°C, 70-80% de humidade relativa) e observadas diariamente. As árvores com sintomas de murchidão foram recolhidas e as agulhas removidas. Tronco e ramos foram separados, pesados e divididos em pequenos fragmentos. Os nemátodes foram extraídos utilizando o método de Whitehead and Hemming¹¹³ durante 48 horas. Machos, fêmeas e juvenis da 3ª etapa dispersiva (JIII) foram identificados e separados através de um estereomicroscópio. Esta etapa foi realizada no IMAR.

1.3 Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada a partir de 13.700 nemátodes de estágios mistos de *B. xylophilus* e 12.000 nemátodes de estágios mistos de *B. mucronatus* crescidos em fungo. No caso dos nemátodes crescidos em pinheiro (*B. xylophilus*) foram utilizados 450 machos, 500 fêmeas e 700 JIII. O procedimento realizado baseou-se no protocolo de isolamento do RNA total de *C. elegans* para microarrays Affymetrix¹¹⁴. Após a lavagem dos nemátodes, foi adicionado Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), sendo posteriormente expostos a 3 ciclos de congelamento e descongelamento a 37°C e azoto líquido/gelo seco. De seguida procedeu-se ao isolamento do RNA total com a sequencial adição de Trizol e clorofórmio, assim como a utilização de etanol a 70% para a precipitação do RNA. A purificação do RNA total foi realizada com o kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Germany). A qualidade do RNA total extraído foi analisada no Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) com o kit RNA 6000 Pico (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) e a quantidade medida por fluorimetria com o kit RNA Quant-iT RiboGreen (Invitrogen, CA, USA).

1.4 Síntese de cDNA

O processo de síntese do cDNA das diferentes amostras foi ajustado tendo em conta a quantidade e a qualidade do RNA extraído das diferentes amostras. Para *B. xylophilus* e *B. mucronatus* crescidos em fungo e *B. xylophilus* machos crescidos em planta o cDNA foi sintetizado pelo kit MINT (Evrogen, Moscow, Russia), a partir de 1-2 microgramas de RNA total. O cDNA das amostras de *B. xylophilus* fêmeas e JIII crescidos em planta foi sintetizado pelo kit SMARTer™ Pico PCR (Clontech, Mountain View, CA, USA) utilizando menos de 30 nanogramas de RNA total. Ambos os métodos baseiam-se na tecnologia SMART¹¹⁵.

A tecnologia “Switching Mechanism at 5’ End of RNA Template” (SMART), na qual o kit de síntese de cDNA MINT se baseia, permite a incorporação eficiente de sequências conhecidas em ambas as extremidades durante a síntese do cDNA recorrendo a uma troca de molde. Esta tecnologia consiste na utilização de um oligonucleótido especial, que se liga a um oligo(dC) adicionado pela enzima transcriptase reversa (RT) na extremidade 3’ da sscDNA, e serve de novo molde para a RT continuar a sintetizar a sscDNA. O primer 3’ oligo(dT) garante a amplificação de moléculas de

mRNA poliA apenas. A única modificação face ao protocolo original do kit de síntese de cDNA MINT (Evrogen, Moscow, Russia) consistiu na modificação do primer 3' pela adição do local de restrição para a enzima BsgI e a redução do número de timinas do componente oligo(dT) de 30 para 20 nucleótidos. O local de restrição garante a remoção das caudas poli A antes da sequenciação, minimizando a interferência de homopolímeros.

O kit de síntese do cDNA utilizado nas amostras de *B. xylophilus* fêmeas e JIII crescidos em planta utiliza a mesma tecnologia que o kit MINT, no entanto contém diferentes constituintes, nomeadamente, o oligonucleótido especial (molde secundário), a enzima RT e o primer 3'. Estes constituintes permitem a obtenção de grande especificidade, reduzido background e elevado rendimento na síntese de cDNA com as características associadas à tecnologia SMART, ou seja, a obtenção de um enriquecido conjunto de cDNA de cadeia dupla de comprimento completo e que compreende a mesma sequência adaptadora em ambas as extremidades. Estas características fazem do kit SMARTer™ Pico PCR uma ótima alternativa para menores quantidades de RNA.

2. Pirosequenciação

A sequenciação do cDNA foi efetuada na plataforma FLX Titanium da 454 de acordo com as instruções standard do fabricante (Roche-454 Life Sciences, Brandford, CT, USA). No processo de sequenciação foram utilizados 500ng de cDNA para cada amostra. Cada uma das amostras de *B. xylophilus* e *B. mucronatus* foram sequenciadas em meia placa de sequenciação.

3. Pipeline de processamento das *reads* e anotação dos contigs

As *reads* geradas pela pirosequenciação do cDNA foram submetidas a um pipeline de análise específico para a obtenção de transcritos e respetiva anotação. As *reads* inicialmente sofreram um processamento das sequências dos adaptadores quer da sequenciação como da síntese do cDNA, as *reads* curtas e de baixa qualidade e as caudas poli-A ainda presentes. Após este processamento, as *reads* foram ensambladas pelo GS *de novo* Assembler (Roche) de forma a originar contigs. As *reads* de cada

amostra foram assembladas individualmente. Foram criadas duas outras bibliotecas, correspondendo uma à assemblagem conjunta das *reads* das 3 amostras de *B. xylophilus* crescido em plantas e outra à assemblagem conjunta das amostras de *B. xylophilus* e *B. mucronatus* crescidos em fungo. As 3 bibliotecas de nemátodes crescidos em fungo e a biblioteca individual de machos crescidos em planta foram assembladas pelo software GS *de novo* Assembler versão 2.6. As bibliotecas individuais de fêmeas e juvenis e a conjunta dos nemátodes crescidos em planta foram assembladas pelo GS *de novo* Assembler versão 2.8.

A identificação das regiões codificantes passou pela pesquisa por BLASTX¹¹⁶ dos contigs na base de dados curada Swiss-Prot (com limite máximo de E-value $1e^{-6}$) para identificação da *frame* correspondente às regiões codificantes. Os contigs com correspondências positivas foram então traduzidos em sequências de aminoácido através de um algoritmo interno ao pipeline desenvolvido no Biocant. Os contigs sem correspondências neste primeiro passo foram submetidos à previsão de péptidos putativos pelo software FrameDP¹¹⁷. Os contigs, novamente, sem previsão foram submetidos a novo processo de previsão de péptidos putativos, mas pelo software ESTScan¹¹⁸. As sequências de aminoácidos previstas pelos softwares FrameDP e ESTScan foram submetidas a um BLASTP¹¹⁶ (com limite de E-value $1e^{-2}$) contra a base de dados não redundante (nr) do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

A anotação funcional consistiu na submissão das sequências das proteínas anotadas por BLASTX e BLASTP na plataforma InterProScan versão 4.8¹¹⁹, de forma a anotar funcionalmente domínios proteicos InterPro¹²⁰ e obter a anotação por categorias Gene Ontology (GO)¹²¹.

O pipeline desenvolvido no Biocant incluiu ainda a ferramenta Myrna versão 1.2.0, um software para análise *in silico* da expressão diferencial de genes e respetiva avaliação estatística, usado em bases de dados de RNA-Seq¹²². Para esta deteção as *reads* são mapeadas contra o transcrito já assemblado através do software GS reference mapper (Roche). Assim, obtém-se a contagem/distribuição das *reads* de cada transcrito individual que são mapeadas face aos contigs gerados no “transcrito conjunto”. Por fim, é calculado um *p-value* para avaliar a significância da diferença entre o número de *reads* de cada transcrito que são mapeados em cada contig gerado no “transcrito conjunto”. Este cálculo tem em conta um fator de normalização

específico para cada contig que inclui variáveis como o número de *reads* mapeadas no contig, o tamanho do contig ou a cobertura do transcrito individual, entre outras.

4. Anotação funcional metabólica dos sistemas biológicos

A anotação funcional de transcritos de interesse e a relação destes a nível metabólico foi analisada consoante a informação de referência depositada na base de dados KEGG (“Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”). As sequências de aminoácidos foram submetidas à ferramenta KAAS (“KEGG Automatic Annotation Server”) visando a anotação segundo termos KEGG Orthology (KO) e consequentemente, a distribuição dessas anotações nas vias metabólicas de referência presentes no KEGG¹²³. A anotação é conseguida através de comparações por BLASTP face à base de dados manualmente curada de genes eucariotas depositados no KEGG.

5. Anotação de peptidases

A identificação de peptidases e inibidores de peptidases foi obtida com recurso à base de dados online de peptidases MEROPS¹²⁴. A organização hierárquica e a classificação estrutural das peptidases permitem a anotação de sequências de aminoácidos segundo os termos da base de dados e a respetiva análise de acordo com as famílias de proteínas descritas. A anotação foi realizada através de uma pesquisa BLASTP. As informações sobre o organismo que apresenta a proteína com maior homologia identificada pelo BLASTP e sobre os substratos das peptidases presentes na base de dados permitem uma análise mais detalhada da anotação funcional dos transcritos e, consequentemente, o estabelecimento de relações funcionais entre estes a nível metabólico e na indução do parasitismo.

6. Anotação de carbohidrases

Conjuntos de genes de interesse foram anotados com a intenção de identificar enzimas ativas na degradação de carboidratos (CAZymes). A plataforma online CAT (“CAZymes Analysis Toolkit”) consiste num conjunto de ferramentas de análise e anotação de CAZymes¹²⁵. A consideração de um conjunto objetivo do conjunto de anotações funcionais adicionais ao pipeline de processamento das *reads* consiste na obtenção da maior quantidade de informação biológica possível. Assim, a anotação de carbohidrases baseou-se na associação das famílias CAZy e os respetivos domínios Pfam. O algoritmo considera todas as sequências das proteínas não redundantes que constituem a base de dados CAZy. A anotação consistiu na comparação segundo um limite E-value máximo de $1e^{-2}$, um bit score limite de 55 e um nível de suporte de 40.

7. Proteínas de potencial mimetização de proteínas de plantas

A identificação de efetores do NMP que visam a mimetização de proteínas de plantas e, conseqüentemente, desencadeiam respostas endógenas na planta sob o controlo do nemátode, foi conseguida através de uma estratégia de comparação de homologia por BLASTP. As sequências dos transcritos a anotar foram comparadas com as sequências do sub-reino Embryophyta (taxid:3193) e do filo *Nematoda* (taxid:6231) depositadas na base de dados NCBI nr. Foram aceites os hits cujo E-value do alinhamento foi menor que $1e^{-6}$ e menor que $1e^{-2}$ para a comparação contra as sequências de plantas e de nemátodes, respetivamente. Esta estratégia permite identificar sequências com grande homologia face a proteínas expressas em plantas e ausentes em nemátodes, estando a sua função, potencialmente, associada à mimetização de funções moleculares específicas do hospedeiro do NMP durante o parasitismo.

8. Proteínas potencialmente secretadas para o meio extracelular

A potencialidade das proteínas serem secretadas pelo nemátode para o meio extracelular foi avaliada pela presença da estrutura de um peptídeo sinal determinada através do servidor SignalP 4.1¹²⁶ e ausência de domínio transmembranar (TM) avaliado pelo servidor TMHMM 2.0¹²⁷ na sequência de aminoácido correspondente a cada transcrito.

9. Detecção de transcritos em *B. xylophilus* ausentes em *C. elegans*

As sequências dos transcritos identificados em *B. xylophilus* foram comparadas por BLASTP contra as sequências de aminoácido de proteínas expressas em *C. elegans* depositadas na base de dados Wormbase, versão WS233¹²⁸. Foram aceites alinhamentos entre homólogos cujo E-value foi inferior a $1e^{-6}$.

10. Mapeamento dos contigs no genoma de *B. xylophilus*

Os contigs gerados por sequenciação dos cinco transcritomas em análise foram mapeados contra os contigs representativos do genoma de *B. xylophilus*²¹, disponíveis na base de dados NCBI nr. O mapeamento foi realizado por BLASTN sobre todos os contigs de cada transcritoma, independentemente da sua anotação estrutural ou funcional. O E-value de limite máximo foi estabelecido em $1e^{-2}$ para que todos os contigs tivessem a oportunidade de serem mapeados, com a mínima confiança⁴². Cada transcrito foi mapeado uma única vez nos contigs do genoma, correspondente ao melhor hit de homologia. O nível de identidade dos alinhamentos resultantes foi determinado nas zonas de homologia identificadas, correspondendo à média dos níveis de identidade de cada um dos alinhamentos nos transcritomas. O nível de cobertura do transcritoma

no genoma foi calculado a partir do número de nucleótidos que alinharam em contigs do genoma face ao comprimento total do transcrito.

11. Validação dos níveis de expressão

11.1 Desenho dos primers

Os primers para os genes em estudo foram desenhados a partir do software Primer Express® v3.0 (Life Technologies, USA). Os primers foram desenhados para uma gama de temperatura de desnaturação entre 58 e 60°C, conteúdo de GC entre 30 e 80% e um comprimento do amplicão entre 70 e 150 nucleótidos.

11.2 Ensaio RT-qPCR

A eficiência de amplificação dos genes em estudo foi otimizada para cerca de 100%, consoante a concentração de primers, tendo sido avaliada simultaneamente a viabilidade da comparação dos genes de interesse face ao gene endógeno utilizado para normalização dos níveis de expressão. A eficiência de amplificação foi calculada segundo a Equação 1 (Figura 8) e a viabilidade da comparação face às eficiências de amplificação dos genes foi determinada pela análise dos ΔC_t s (Equação 2 na Figura 8). Foi assumido que um gene alvo pode ser normalizado pelo gene endógeno se o declive da representação gráfica dos ΔC_t s em função do logaritmo das concentrações padrão do cDNA utilizado fosse inferior a 0,1¹²⁹. Esta análise implicou que o estudo da eficiência de amplificação de todos os genes alvo se baseasse de dados gerados em placas que também continham a amplificação do gene endógeno nas suas condições ótimas.

$$Eficiência = [10^{\frac{-1}{declive}}] - 1 \quad \text{Equação 1}$$

$$\Delta C_t = C_{t_{gene\ alvo}} - C_{t_{gene\ endógeno}} \quad \text{Equação 2}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{amostra\ alvo}} - \Delta C_{t_{amostra\ controle}} \quad \text{Equação 3}$$

Figura 8 - Equações matemáticas envolvidas no cálculo da expressão relativa por RT-qPCR.

Inicialmente pretendia-se otimizar as condições de amplificação no mesmo cDNA que foi sequenciado. No entanto, de acordo com a quantidade escassa deste

cDNA surgiu a necessidade de encontrar uma alternativa, para ambos os organismos. Para os genes em *B. xylophilus* foi utilizado um cDNA do isolado geográfico 17 de *B. xylophilus* crescido em fungo anteriormente sequenciado no âmbito de outro projeto de investigação desenvolvido no Biocant (Cantanhede, Portugal). O estudo da amplificação dos genes em *B. mucronatus* foi realizado num cDNA sintetizado *de novo* a partir do mesmo RNA que originou o cDNA sequenciado neste estudo.

A expressão relativa dos genes de interesse foi calculada segundo o método $2^{\Delta\Delta Ct}$ ¹²⁹, que implica a comparação do ΔCt entre a amostra alvo e a amostra de calibração (Equação 3 na Figura 8).

Todos os ensaios de RT-qPCR foram realizados no instrumento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Singapura). Os ensaios de real time PCR foram realizados em volumes de reação de 10 μ L contendo 5 μ L de Fast SYBR Green Master Mix 2x (Applied Biosystems, USA), 1 μ L de cDNA e volumes variáveis dos primer específicos e de ddH₂O de acordo com as eficiências de amplificação de cada gene e a respetiva concentração de primer ótima. As condições de PCR consistiram na desnaturação inicial do cDNA com um ciclo de 95°/20seg, seguindo-se 40 ciclos de amplificação, em que cada ciclo compreendeu a desnaturação a 95°/3seg e ligação do primer e extensão da cadeia a 60°/30seg. A análise das curvas de melting foi realizada imediatamente após a reação de PCR, segundo os parâmetros pré-definidos do aparelho, com base nas seguintes condições: 95°C/5seg, 60°C/60seg, 95°C/15seg e 60°C/15seg. As amostras foram preparadas e analisadas em paralelo, incluindo controlos negativos em todas as reações de amplificação. O gene endógeno utilizado neste estudo foi o homólogo 42 da proteína de controlo do ciclo celular (CDC-42), largamente utilizado na literatura em estudos de RT-qPCR sobre nemátodes¹³⁰ e considerado como estável em *C. elegans* para a utilização em ensaios de RT-qPCR¹³¹.

A análise das diferenças entre os níveis de expressão e o respetivo nível de significância estatística foi realizada com o software REST¹³². A significância foi obtida por um teste de permutação utilizando 10 000 iterações, sendo esta a única alteração ao procedimento predefinido pelo software, a qual foi adotada em outros estudos descritos na literatura^{133,134}. Considerou-se uma expressão génica diferencialmente significativa aquando da obtenção de *p-values* indicados pelo REST como inferiores a 0,05. Adicionalmente, os níveis de expressão relativa superiores a duas vezes face à amostra de calibração também foram considerados potencialmente sobre-expressos com interesse biológico¹³⁵.

Resultados e discussão

1. Produção de material genético para sequenciação

O estudo de transcritômica comparativa foi efetuado entre os transcritomas de nemátodes *B. xylophilus* e *B. mucronatus*, visando a identificação de potenciais marcadores de patogenicidade do nemátode parasita de plantas, NMP. Na comparação foram utilizadas 5 amostras: *B. xylophilus* e *B. mucronatus* crescidos em fungo e machos, fêmeas e JIII de *B. xylophilus* crescidos em planta. A comparação entre os diferentes transcritomas permitiu obter várias perspectivas sobre a biologia do nemátode e a descoberta de novas vias/genes potencialmente envolvidas na patogenicidade. As comparações efetuadas incidiram sobre o nemátode parasita *B. xylophilus* e o nemátode não parasita *B. mucronatus*, fase de desenvolvimento dispersivo face ao desenvolvimento propagativo e entre *B. xylophilus* crescido em condições não limitantes (fungo) e no pinheiro. Diversas estratégias de transcritômica comparativa foram adotadas para a identificação de genes potencialmente envolvidos no mecanismo de patogenicidade do NMP, com recurso a ferramentas bioinformáticas para a organização dos dados gerados na sequenciação dos transcritomas, e permitindo análises orientadas para a informação com maior potencial biológico.

Todo o processo de processamento dos nemátodes, após a sua recolha dos respetivos meios de crescimento, foi estabelecido no Biocant. A extração do RNA total foi efetuada de igual forma para todas as amostras, obtendo-se material genético, no final do processo, de muito boa qualidade. O valor médio de RIN obtido no Bioanalyser foi de 8,4 (Tabela 3). A quantidade de RNA total obtido foi influenciada pelo número inicial de nemátodes, sendo que a quantidade de RNA para as amostras de *B. xylophilus* crescidos em pinheiro não foi quantificada devido ao reduzido volume obtido. Independentemente da concentração, a quantidade de RNA total foi concentrada ao volume inicial necessário para o procedimento de síntese de cDNA. A última etapa para a síntese das bibliotecas de cDNA representativas de cada transcritoma gerou material genético de concentração similar, em média 14,87 µg/µL (Tabela 3).

Os resultados obtidos na etapa precedente da sequenciação permitiram a obtenção de material genético em quantidade e qualidade suficiente para reproduzir bons resultados na etapa de sequenciação na plataforma FLX Titanium da 454.

Tabela 3 - Resultados experimentais obtidos nos processos de extração de RNA total e síntese de cDNA. O RNA total foi isolado de *B. xylophilus* e de *B. mucronatus* a partir de culturas mantidas em fungo e de pinheiros inoculados. O RNA total foi extraído pelo o método de Trizol para microarrays Affymetrix¹¹⁴ e o cDNA sintetizado com a tecnologia SMART¹¹⁵. A qualidade do RNA foi avaliada por electroforese capilar (Bioanalyzer) e a quantidade medida por fluorimetria. A quantidade de cDNA foi avaliada por espetofotometria.

	<i>B. xylophilus</i> (fungo)	<i>B. mucronatus</i> (fungo)	<i>B. xylophilus</i> (pinheiro)		
			macho	fêmea	JIII
Extração de RNA total					
Número de nemátodes	13.700	12.000	450	500	700
Qualidade (RIN)	9	9	8	8.6	7.5
Concentração (ng/μL)	236	63	-	-	-
Síntese de cDNA					
Concentração (μg/μL)	17,29	19,54	12,94	12,03	10,55

2. Processamento dos dados da sequenciação

A pirosequenciação dos cinco transcritomas gerou em média 455.000 *reads* por transcritoma, o equivalente a cerca de 160 Mb (Tabela 4). O GS *de novo* Assembler gerou 8.500 contigs por transcritoma em média, que por sua vez geraram a identificação de 9.000 transcritos, em média (Tabela 4). Em média, cerca de 60% dos transcritos em cada transcritoma foram anotados funcionalmente por domínios proteicos através do InterPro (Tabela 4), resultado concordante com o nível de anotação funcional de transcritomas de outros nemátodes parasitas de plantas¹³⁶ e do genoma de *B. xylophilus*^{21,42}. Esta percentagem de anotação também constitui um indicador da qualidade dos dados gerados pela sequenciação, na medida em que os contigs ensamblados geraram transcritos com características estruturais semelhantes a proteínas depositadas na base de dados curada Swiss-Prot e que estão caracterizadas funcionalmente na literatura. O resultado de que 40% dos transcritos não obteve anotação, sugere que possivelmente existam muitas proteínas específicas destes grupos de nemátodes que não foram ainda identificadas e caracterizadas, o que está de acordo

com a grande quantidade de informação por elucidar sobre o NMP e o respetivo processo de parasitismo.

Tabela 4 - Sumário dos resultados da montagem e anotação das sequências geradas na pirosequenciação dos cinco transcritomas. As *reads* de cada transcritoma foram montadas em contigs através do GS *de novo* Assembler e a região codificante de cada contig identificada por BLASTX, FrameDP e ESTScan. A função de cada transcrito foi anotada de acordo com os domínios proteicos através do InterPro e das categorias Gene Ontology. O número total de péptidos corresponde ao número de transcritos gerados a partir da anotação dos contigs segundo as abordagens BLASTX, FrameDP e ESTScan. bp: par de bases.

	<i>B. xylophilus</i> (fungo)	<i>B. mucronatus</i> (fungo)	<i>B. xylophilus</i> (pinheiro)		
			macho	fêmea	JIII
# <i>Reads</i>	647.641	465.256	407.835	227.307	531.049
# Contigs	11.006	8.822	6.724	5.760	10.608
Tamanho médio dos contigs (bp)	384	337	325	348	372
# Péptidos identificados por BLASTX	7.025	5.287	3.965	4.047	6.894
# Péptidos detetados por FrameDP	4.461	3.574	2.547	1.764	3.834
# Péptidos detetados por ESTScan	552	370	385	202	716
# Total de péptidos	12.038	9.231	6.897	6.013	11.444
# Péptidos com termos GO	5.453	4.067	3.115	3.107	5.338
# Péptidos anotados por InterPro	7.321	5.547	4.148	4.135	7.120

O mapeamento dos contigs montados no genoma de *B. xylophilus*²¹ apresentou, em média, uma identidade de 99% para os transcritomas de *B. xylophilus* e de 92% para *B. mucronatus* (Tabela 5). A cobertura dos transcritomas foi maior que 90% em *B. xylophilus* e igual a 80% para *B. mucronatus*. Estes resultados revelam que os transcritomas gerados são de grande qualidade e constituem material de estudo de confiança para um estudo exploratório de identificação de proteínas expressas pelos nemátodes.

Tabela 5 - Mapeamento dos transcritos no genoma de *B. xylophilus*. Os resultados do BLASTN com um limite de E-value de $1e^{-2}$ dos contigs de cada transcrito contra os contigs do genoma de *B. xylophilus* foram analisados para o cálculo do nível de identidade e cobertura de cada transcrito.

	<i>B. xylophilus</i> (fungo)	<i>B. mucronatus</i> (fungo)	<i>B. xylophilus</i> (pinheiro)		
			macho	fêmea	JIII
Cobertura do transcrito	91,1%	80,4%	96,1%	97,0%	95,6%
Identidade	98,9%	92,1%	98,8%	99,2%	99,0%

A anotação funcional segundo os termos GO permite a caracterização de produtos da expressão dos genes em componentes celulares, função molecular e processos biológicos associados (Tabela 6). Com base nas anotações dos transcritos em estudo a nível da localização compartimental na célula, 33% das anotações pertenceram às categorias “Célula” e “Componente celular”, seguido de 13% para “Organelo” e “Complexo macromolecular” com 8%. Em termos da função molecular das sequências de aminoácido identificadas, a categoria “Ligação” (48%), seguido de “Atividade catalítica” (36%), “Moléculas estruturais” e “Transportadores”, ambas com 4% foram as categorias mais proeminentes. Adicionalmente, as categorias “Processo metabólico” e “Processo Celular” foram as mais representadas entre os termos relativos aos processos biológicos. Os resultados obtidos nesta estratégia de anotação funcional são similares aos obtidos em outros estudos sobre o nemátode *B. xylophilus*¹³⁵.

O nível de análise da anotação apresentada na Tabela 6 é pouco refinado, evidenciando os processos biológicos básicos dos seres vivos. Não foram identificadas diferenças significativas entre a representatividade dos vários termos GO apresentados na Tabela 3. O nível hierárquico analisado foi o de nível 2, permitindo a caracterização de processos metabólicos e funções metabólicas a um patamar macromolecular. A comparação entre transcritos de nemátodes crescidos em fungo face aos crescidos em planta, à partida, seria a que maior potencialidade apresentava de serem identificadas diferenças. No entanto, tal não se verificou.

Tabela 6 - Anotação funcional segundo os termos GO. Os números de cada categoria e transcrito indicam a percentagem de transcritos anotados com termos GO em cada um dos termos de nível 2 na hierarquia de anotação. Todos os transcritos em estudos foram anotados e os níveis de anotação comparados em cada termo em análise.

	<i>B. xylophilus</i> (fungo)	<i>B. mucronatus</i> (fungo)	<i>B. xylophilus</i> (pinheiro)		
			machos	fêmeas	JIII
Componente celular					
Região extracelular	2,00	2,39	1,91	1,88	1,55
Célula	33,85	33,42	33,28	33	35,09
Lúmen	0,74	0,8	0,68	0,83	0,61
Complexo macromolecular	8,48	9,07	9,91	9,92	8,26
Organelo	13,93	13,76	14,14	14,18	12,81
Meio extracelular	1,50	1,85	1,47	1,43	1,32
Componente de organelo	5,27	5,12	5,19	5,69	4,51
Componente de sinapse	0,19	0,08	0,07	0,03	0,38
Componente celular	33,85	33,42	33,28	33	35,09
Sinapse	0,19	0,08	0,07	0,03	0,38
Parte de região extracelular	1,50	1,85	1,47	1,43	1,32
Função molecular					
Fatores de transcrição	1,69	1,38	1,42	0,92	2,2
Atividade catalítica	36,46	37,61	38,7	36,67	34,87
Moléculas estruturais	4,16	4,42	4,86	3,97	3,5
Transportadores	4,29	3,57	3,58	3,11	4,62
Ligação	48,4	48,06	47,27	51,18	48,73
Transportadores de eletrões	0,86	0,83	0,85	0,86	1,1
Antioxidantes	0,42	0,48	0,4	0,43	0,36
Reguladores de canais	0	0,02	0	0	0
Reguladores de enzimas	1,38	1,51	1,33	1,27	1,46
Reguladores de transcrição	0,99	0,96	0,85	0,92	1,1
Transdutores moleculares	1,36	1,14	0,74	0,66	2,05

Tabela 6. Anotação funcional segundo os termos GO. Representação da porcentagem de transcritos anotados com termos GO em cada um dos termos de nível 2 na hierarquia de anotação. Todos os transcritomas em estudo foram anotados e os níveis de anotação comparados em cada termo em análise. (Continuação)

	<i>B. xylophilus</i> (fungo)	<i>B. mucronatus</i> (fungo)	<i>B. xylophilus</i> (pinheiro)		
			machos	fêmeas	JIII
Processo biológico					
Reprodução	0	0,02	0	0	0,02
Sistema imune	0,05	0,05	0,03	0,06	0,02
Processo metabólico	38,42	40,23	40,65	39,26	36,74
Proliferação celular	0,03	0,05	0,03	0,03	0,02
Processo celular	32,41	32,61	33,5	33,22	30,3
Utilização de carbono	0,05	0,05	0,06	0,06	0,03
Reprodução viral	0	0,02	0	0	0
Morte	0,02	0,02	0	0,03	0,02
Reprodução	0	0,02	0	0	0,02
Adesão biológica	0,22	0,26	0,32	0,3	0,38
Processos de sinalização	1,35	1,35	1,24	1,39	1,84
Sinalização	3	2,61	2,42	1,95	3,94
Processos multi-organismo	0,2	0,14	0,12	0,12	0,21
Processos de desenvolvimento	0,22	0,16	0,15	0,15	0,23
Locomoção	0	0,02	0	0	0
Resposta a estímulos	2,03	1,7	1,65	2,04	2,07
Localização	9,25	8,41	8,09	8,73	10,1
Estabelecimento de localização	9,23	8,36	8,04	8,64	10,07
Processos multi-organismo	0,03	0,07	0,06	0	0
Regulação biológica	3,49	3,84	3,63	4,02	4,01

3. Anotação funcional metabólica

O mapeamento dos transcritos identificados nas vias metabólicas de referência na base de dados KEGG permite anotar funcionalmente os transcritomas e identificar

diferenças metabólicas entre as populações de nemátodes em estudo. Em média, cerca de 20% das sequências codificantes de proteínas foram anotadas com termos “KEGG Orthology” (KO) (Tabela 7). Como a anotação do KEGG é a nível da proteína, e não de domínios proteicos como o InterPro ou categorias como o GO, o nível de similaridade é mais restrito. O facto da base de dados KEGG conter maioritariamente informação metabólica de humanos *Homo sapiens* e os organismos modelo como *Mus musculus*, a informação relativa a nemátodes não tem níveis de anotação consideráveis.

Tabela 7 - Anotação funcional dos transcritos pelo KEGG. Resultados quantitativos da anotação dos transcritos dos cinco transcritomas em estudo na base de dados KEGG. Estes resultados contemplam os dados obtidos para 5 das referências hierárquicas de maior nível na base de dados: “Metabolismo”, “Processamento de informação genética”, “Processamento de informação ambiental”, “Processos celulares” e “Sistemas do organismo”.

	<i>B. xylophilus</i> (fungo)	<i>B. mucronatus</i> (fungo)	<i>B. xylophilus</i> (pinheiro)		
			machos	fêmeas	JIII
% de transcritos anotados	15,7	18,3	19,7	24,0	17,4
# KOs identificados	1.626	1.443	1.188	1.276	1.586
# Vias metabólicas mapeadas	236	229	231	226	236

A Tabela 7 indica que os transcritomas de fêmeas e machos obtiveram maior percentagem de anotação dos transcritos, enquanto os transcritomas de *B. xylophilus* crescido em fungo e JIII crescidos em planta obtiveram um menor nível de anotação. Estes resultados refletiram-se na distribuição comparativa dos transcritos nas vias metabólicas/processos biológicos presentes no KEGG (Tabela 8), com o favorecimento para os transcritomas com maior percentagem de anotação. O número de transcritos anotados pertencentes aos diferentes níveis em análise, foi comparado de forma a avaliar a existência de diferenças na representação dos transcritos entre os níveis de anotação. Os termos “Metabolismo e biossíntese de glicanos”, “Sistema endócrino” e “Sistema nervoso” foram os que apresentaram maior distribuição diferencial entre os transcritos dos transcritomas em comparação (Tabela 8). A via de “Metabolismo e biossíntese de glicanos”, apresenta proteínas relacionadas com a degradação de glicanos, evidenciando a potencialidade desta estratégia na identificação de interações dos nemátodes com os polissacarídeos da planta, nomeadamente os da parede celular. Os resultados dos termos “Sistema endócrino” e “Sistema nervoso” são interessantes na

medida em que podem estar relacionados por transcritos que partilham KOs envolvidos em ambos os termos. Apesar do reduzido conhecimento sobre os processos biológicos do sistema nervoso e mecanismos de sinalização celular em nemátodes, a estratégia utilizada permitiu identificá-los como potencialmente importantes no parasitismo pela diferença de representação entre *B. xylophilus* e *B. mucronatus*.

Tabela 8 - Distribuição dos transcritos nas vias metabólicas KEGG. Os transcritos foram anotados através da ferramenta KAAS, sendo apresentada a percentagem de transcritos em relação ao número total de transcritos para cada via de cada transcriptoma.

	<i>B. xylophilus</i> (fungo)	<i>B. mucronatus</i> (fungo)	<i>B. xylophilus</i> (pinheiro)		
			machos	fêmeas	JIII
Metabolismo					
Metabolismo de carboidrato	1,84	2,31	2,80	3,04	1,88
Metabolismo energético	1,04	1,32	1,65	1,95	1,13
Metabolismo lipídico	1,32	1,49	1,70	2,08	1,35
Metabolismo de nucleótidos	0,88	1,15	1,17	1,46	1,00
Metabolismo de aminoácidos	1,60	1,88	2,19	2,48	1,63
Metabolismo de outros aminoácidos	0,35	0,42	0,58	0,58	0,42
Metabolismo e biossíntese de glicanos	0,80	0,58	0,70	0,91	0,78
Metabolismo de cofatores e vitaminas	0,52	0,61	0,64	0,78	0,54
Metabolismo de terpenóides e polacetídeos	0,19	0,21	0,22	0,28	0,17
Biossíntese de outros metabolitos secundários	0,17	0,22	0,22	0,22	0,19
Metabolismo e biodegradação de xenobióticos	0,47	0,54	0,67	0,75	0,54
Processamento de informação genética					
Transcrição	1,09	1,35	1,45	1,93	1,04
Tradução	2,62	3,21	3,57	4,71	2,64
Enrolamento, separação e degradação	2,00	2,47	2,81	3,26	2,09
Replicação e reparação	0,87	0,97	0,75	1,43	0,66

Tabela 8 - Distribuição dos transcritos nas vias metabólicas KEGG. Os transcritos foram anotados através da ferramenta KAAS, sendo apresentada a porcentagem de transcritos em relação ao número total de transcritos para cada via de cada transcritoma. (Continuação)

	<i>B. xylophilus</i> (fungo)	<i>B. mucronatus</i> (fungo)	<i>B. xylophilus</i> (pinheiro)		
			machos	fêmeas	JIII
Processamento de informação ambiental					
Transporte através da membrana	0,10	0,09	0,13	0,13	0,09
Tradução de sinais	2,86	2,89	3,31	3,61	3,26
Moléculas e interações de sinalização	0,14	0,11	0,10	0,12	0,21
Processos celulares					
Transporte e catabolismo	1,45	1,70	1,97	2,51	1,63
Motilidade celular	0,30	0,35	0,38	0,50	0,37
Crescimento e morte celular	1,70	1,53	1,58	2,53	1,27
Comunicação celular	0,76	0,89	0,84	1,00	0,91
Sistemas do organismo					
Sistema imunitário	1,38	1,53	1,51	1,73	1,51
Sistema endócrino	1,56	1,48	1,65	1,76	1,65
Sistema circulatório	0,31	0,30	0,46	0,50	0,35
Sistema digestivo	0,70	0,65	0,87	0,90	0,81
Sistema de excreção	0,46	0,54	0,61	0,68	0,52
Sistema nervoso	1,63	1,58	1,93	1,65	1,77
Sistema sensorial	0,16	0,16	0,28	0,13	0,19
Desenvolvimento	0,31	0,36	0,29	0,40	0,36
Adaptação ambiental	0,31	0,31	0,35	0,40	0,33
Sistema imunitário	1,38	1,53	1,51	1,73	1,51

4. Redução da redundância nos transcritomas

A quantidade de dados gerados pelas novas tecnologias de sequenciação é enorme, revelando a potencialidade destas permitirem a análise detalhada de sistemas biológicos completos¹⁰³. No entanto, a organização e análise dos dados gerados requerem ferramentas bioinformáticas para que respostas biológicas de interesse possam ser alcançadas.

A ferramenta CD-Hit visa a eliminação de redundância de grandes conjuntos de dados pela formação de *clusters* de sequências biológicas, que partilham um determinado nível de similaridade, permitindo aumentar a eficiência de análises posteriores sobre as sequências.

O CD-Hit foi então utilizado para diminuir a quantidade de informação gerada em cada transcritoma (sequências duplicadas e outras formas de redundância) e de forma comparativa, constituindo uma interessante ferramenta de transcritômica comparativa.

O nível de similaridade utilizado como limite para o *clustering* das sequências de aminoácidos foi de 80%, tendo este valor sido alvo de estudo para estabelecer um equilíbrio entre a redução da redundância dos transcritomas e a confiança dos resultados gerados (Tabela Suplementar 1). Os resultados da redução da redundância nos transcritomas estão apresentados na Tabela 9. Consoante o número total de transcritos em cada transcritoma, foi obtida uma maior redução da redundância (10%) para os transcritomas com maior quantidade de informação. No mínimo, conseguiu-se obter uma redução de 3%, correspondente à eliminação de mais de 300 sequências, no transcritoma de fêmeas *B. xylophilus* crescidas em pinheiro.

Tabela 9 - Redução da redundância através da ferramenta CD-Hit. Os transcritos foram agrupados por similaridade com um limite mínimo de 80% e a percentagem da redução do número de sequências de aminoácidos originais calculada face ao número total de transcritos em cada transcrito.

	<i>B. xylophilus</i> (fungo)	<i>B. mucronatus</i> (fungo)	<i>B. xylophilus</i> (pinheiro)		
			macho	fêmea	JH
# Total de sequências de aminoácidos	12.038	9.231	6.897	6.013	11.444
# <i>Clusters</i>	10.790	8.719	6.522	5.812	10.286
Redução da redundância	10%	6%	5%	3%	10%

5. Transcritômica comparativa a partir de *clusters*

Todas as sequências dos cinco transcritomas foram submetidas em conjunto na ferramenta CD-Hit dividindo-as em *clusters*, com um nível de identidade mínimo de 80%. De seguida, as proteínas foram analisadas segundo proteínas específicas de cada transcrito e as partilhadas por pelo menos dois deles. O conjunto de proteínas foi agrupado em 19.584 *clusters*, em que 9.831 são constituídos por sequências de pelo menos dois transcritomas. Os transcritomas com mais *clusters* exclusivos foram o de *B. mucronatus* e de *B. xylophilus* crescidos em fungo (Tabela 10). Conseguiu-se, assim, obter um conjunto de sequências representativas dos diversos *clusters* e, potencialmente, representativas de diversas funções moleculares específicas de cada transcrito.

A organização dos dados iniciais em *clusters* pelo CD-Hit representa um ponto de partida de transcritômica comparativa, permitindo a realização de pesquisas dirigidas de acordo com os objetivos do estudo e visando a identificação de proteínas específicas de *B. xylophilus* comparativamente a *B. mucronatus*, de proteínas de *B. xylophilus* exclusivamente expressas em planta e de proteínas específicas entre as diferentes formas de vida de *B. xylophilus* estudadas em planta.

Tabela 10 - Clusters específicos de cada transcrito. Todas as proteínas dos cinco transcritomas foram organizadas em *clusters* com um limite mínimo de similaridade de 80% e foram identificados os *clusters* específicos de cada transcrito.

	<i>B. xylophilus</i> (fungo)	<i>B. mucronatus</i> (fungo)	<i>B. xylophilus</i> (pinheiro)		
			macho	fêmea	JH
# <i>Clusters</i> específicos	2.468	2.844	1.077	855	3.279

5.1 Comparação entre *B. xylophilus* e *B. mucronatus*

A eficiência da abordagem transcritômica com recurso ao CD-Hit foi testada com a comparação entre os transcritomas de *B. xylophilus* e *B. mucronatus* crescidos em fungo. O nosso primeiro objetivo foi avaliar as diferenças entre os dois organismos de forma a identificar características específicas do NMP com valor biológico no parasitismo. Os três conjuntos de sequências de interesse, específicas de *B. xylophilus*, específicas de *B. mucronatus* e comuns entre os dois transcritomas, serviram de base para análises posteriores.

5.1.1 Transcritômica comparativa integrada com Myrna

O facto da abordagem direta do CD-Hit sobre os transcritomas não permitir a análise de sequências diferencialmente expressas entre os transcritomas em análise promoveu a utilização de abordagens de transcritômica comparativa complementares para incluir esta informação. Isto porque este grupo de proteínas possui grande interesse na medida em que as proteínas importantes no parasitismo podem não corresponder somente a proteínas específicas de *B. xylophilus* mas a sua expressão diferencial contribuir, também, para uma maior capacidade de induzir a infeção no hospedeiro.

A inclusão de transcritos diferencialmente expressos foi conseguida com recurso a uma biblioteca conjunta que resultou da assemblagem das *reads* correspondentes aos transcritomas de *B. xylophilus* e *B. mucronatus* crescidos em fungo, necessária para a utilização da ferramenta Myrna. Os dados contidos nesta biblioteca permitem saber a contribuição das *reads* de cada transcrito para a formação de cada contig. A inclusão da biblioteca conjunta permite que adicionemos os resultados da análise do Myrna à

análise estrutural conseguida com o CD-Hit. Esta estratégia admite, assim, integrar um segundo nível de transcritômica comparativa, no qual o Myrna permite a realização de pesquisas segundo grupos de proteínas com diferentes níveis de expressão entre os dois transcritomas. O esquema de análise está representado na Figura 9.

A estratégia de comparação teve por base 3 bibliotecas de transcritos (*B. xylophilus* crescido em fungo, *B. mucronatus* crescido em fungo e a conjunta dos 2 transcritomas individuais) e visou a construção de 3 conjuntos de sequências (específicas de *B. xylophilus*, específicas de *B. mucronatus* e partilhadas entre os 2 organismos). Nem todas as sequências presentes na biblioteca conjunta são partilhadas pelos organismos, ou seja, são formadas por *reads* provenientes dos transcritomas de ambos os organismos. Adicionalmente, também existem sequências formadas apenas por *reads* de *B. xylophilus* ou somente por *reads* de *B. mucronatus*. Assim, foi necessário identificar a proveniência de todas as sequências constituintes da biblioteca conjunta e separá-las em conjuntos de sequências específicas de *B. xylophilus*, específicas de *B. mucronatus* e partilhadas entre os 2 organismos (Figura 9). Esta abordagem foi necessária para que na análise das sequências presentes na constituição dos *clusters* gerados pelo CD-Hit fosse possível identificar a origem e a partilha de cada sequência entre os transcritomas. Caso contrário, todos os *clusters* constituídos por pelo menos uma sequência da biblioteca conjunta seriam considerados de comuns entre os organismos, perdendo assim informação potencialmente relevante.

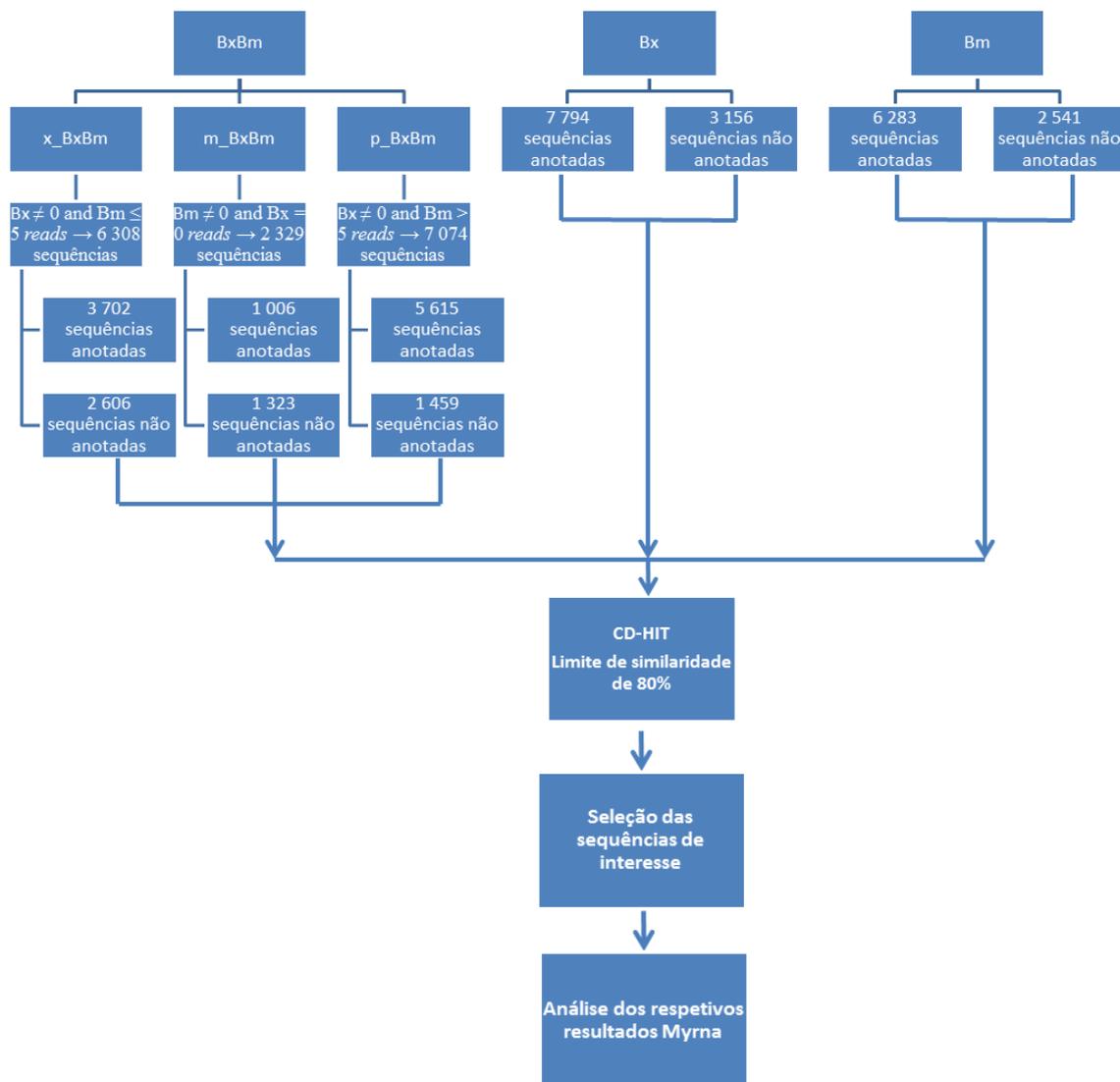


Figura 9 - Esquema ilustrativo da abordagem transcritômica comparativa integrada com Myrna. Representação esquemática de todo o processo desde a divisão das sequências pertencentes às bibliotecas de *B. xylophilus* (Bx), *B. mucronatus* (Bm) e a conjunta entre os dois organismos (BxBm) até à análise dos resultados de expressão diferencial pelo Myrna. A biblioteca conjunta foi dividida em sequências específicas de *B. xylophilus* (x_BxBm), específicas de *B. mucronatus* (m_BxBm) e partilhadas entre os dois organismos (p_BxBm), permitindo, posteriormente, a integração dos resultados do Myrna, quanto a sequências diferencialmente expressas entre os dois organismos.

O grupo da biblioteca conjunta correspondente a sequências específicas de *B. xylophilus* integrou as sequências constituídas por pelo menos uma *read* do transcrito de *B. xylophilus* e por um máximo de 5 *reads* de *B. mucronatus* (Figura 9). Por sua vez, o grupo das sequências específicas de *B. mucronatus* consistiram nas sequências sem contribuição do transcrito de *B. xylophilus*, logo apenas com contribuição de *B. mucronatus* (Figura 9). As restantes sequências da biblioteca conjunta integraram o grupo das sequências comuns entre os dois organismos (Figura 9). A diferença de

critério na definição de sequências específicas de *B. xylophilus* e *B. mucronatus* visa a integração de maior quantidade possível de informação com potencial biológico de acordo com os objetivos da comparação. Como os objetivos consistiram na identificação de genes potencialmente envolvidos no parasitismo de *B. xylophilus*, o favorecimento da informação referente a este organismo foi obtido pela consideração, para além das sequências somente constituídas por *reads* de *B. xylophilus*, das sequências com reduzida contribuição de *B. mucronatus*. A contribuição de *B. mucronatus* nestas sequências pode estar envolvida com limitações da abordagem experimental, como a assemblagem dos contigs. Desta forma, diminuímos o risco de perder informação biologicamente relevante, apenas porque o contig foi assemblado, em conjunto com um elevado número de *reads* de *B. xylophilus*, por 1, 2, 3, 4 ou 5 *reads* de *B. mucronatus* (Figura 9).

Após a divisão da biblioteca conjunta em 3 grupos de sequências, cada um destes e os dois transcritomas conjuntos foram divididos em sequências anotadas e não anotadas, segundo a anotação por BLAST, InterPro e GO (presente no pipeline de processamento das *reads*). Esta segunda divisão permite a análise da função e estrutura características de cada *cluster* de acordo com as sequências que o constituem. No final, comparámos 3 grandes conjuntos de sequências: as presentes em *B. xylophilus* com contribuição das sequências do transcritoma individual do organismo e das específicas de *B. xylophilus* provenientes da biblioteca conjunta; as presentes em *B. mucronatus* compreendendo as sequências do transcritoma individual do organismo e das específicas de *B. mucronatus* provenientes da biblioteca conjunta; e as sequências partilhadas pelos 2 organismos identificadas *a priori* a partir da biblioteca conjunta (Figura 9).

Todas as sequências foram submetidas à ferramenta CD-Hit em conjunto, podendo ser diferenciadas por marcações no nome, de acordo com o grupo de origem e organizadas em *clusters* com um nível de similaridade mínimo de 80% (Figura 9). A constituição dos *clusters* foi analisada manualmente e identificados aqueles somente constituídos por sequências presentes em *B. xylophilus*, por sequências presentes em *B. mucronatus* e os restantes, constituídos por sequências dos dois organismos e sequências identificadas como partilhadas através da biblioteca conjunta. Os diferentes resultados gerados pelo CD-Hit são organizados como apresentado na Tabela 11. O *cluster* 0 é constituído por sequências dos dois organismos (Tabela 11), sendo considerado como partilhado por estes. O *cluster* 3 é apenas constituído por sequências

de *B. xylophilus*, enquanto o cluster 82 é constituído somente por sequências de *B. mucronatus* (Tabela 11), sendo considerados como específico de *B. xylophilus* e específico de *B. mucronatus*, respetivamente. A sequência representativa de cada *cluster* corresponde à sequência com anotação (caso esteja presente na constituição do *cluster* pelo menos uma) e de maior comprimento a nível de aminoácido. As sequências representativas dos vários *clusters* constituíram os conjuntos de sequências específicas de *B. xylophilus*, específicas de *B. mucronatus* e comuns aos dois organismos. Estes conjuntos foram a base das análises posteriores.

Tabela 11 - Exemplo dos resultados gerados pelo CD-Hit. Representação dos três diferentes tipos de *clusters* obtidos consoante a presença de sequências provenientes do transcrito de *B. xylophilus* (Bx), do transcrito de *B. mucronatus* (Bm) e dos três conjuntos de sequências específicas obtidos pela divisão da biblioteca conjunta, isto é, as sequências específicas de *B. xylophilus* (x_BxBm), sequências específicas de *B. mucronatus* (m_BxBm) e sequências partilhadas pelos dois organismos (p_BxBm). A sequência apresentada é a representativa do respetivo cluster.

#Cluster	Bx	Bm	x_BxBm	m_BxBm	p_BxBm	Sequência
0	3	3	1	2	2	BmPt2_000804
3	3	0	3	0	0	BmPt2_BxPt17_001706
82	0	4	0	1	0	BmPt2_BxPt17_012405

Os resultados globais dos conjuntos identificados são apresentados na Tabela 12. O conjunto de sequências específicas de *B. xylophilus* é constituído por 6.185 sequências, enquanto o número de sequências específicas de *B. mucronatus* é de 2.561 sequências. Construímos, assim, um conjunto de informação mais reduzido que o transcrito original de *B. xylophilus*, o que permite análises mais detalhadas e potencialmente mais reveladoras de indicações biológicas importantes sobre o nemátode. O conjunto de sequências detetadas em ambos os transcritos é de 7.885, associadas a processos biológicos comuns entre nemátodes.

Dentro dos *clusters* formados, a percentagem de sequências de aminoácidos com anotação varia de amostra para amostra (Tabela 12), mas revela que muitos dos transcritos são ainda desconhecidos e podem representar informação nova dos dois nemátodes. Foi considerado um filtro adicional para selecionar as sequências com maior interesse biológico e eliminar alguma redundância. Este consistiu na consideração exclusiva de sequências anotadas pela estratégia BLASTP no pipeline de processamento

de *reads* com E-value inferior a 10^{-6} . Utilizando estes parâmetros, o conjunto de maior importância, o das sequências específicas de *B. xylophilus*, foi reduzido a 2.986 sequências, representando um bom conjunto de partida para análises posteriores. Conseguimos, assim, reduzir o nível de informação a analisar, eliminando redundância e sem perder potencialidade de valor biológico nas sequências identificadas. Este conjunto representa um bom ponto de partida para a identificação de novos efetores envolvidos no mecanismo de patogenicidade do NMP, para consequente avaliação do nível de expressão entre as amostras sob estudo por RT-qPCR.

Tabela 12 - Constituição dos *clusters* de interesse gerados no pipeline da abordagem transcritômica comparativa integrada com Myrna. Os *clusters* em análise foram identificados por conterem apenas sequências do transcrito de *B. xylophilus* ou sequências específicas de *B. mucronatus* ou serem constituídos por sequências provenientes dos dois transcritos. A anotação das sequências específicas foi calculada entre o número de sequências específicas anotadas (pelas abordagens BLASTP e InterPro) e o número *clusters* específicos. O número de *clusters* corresponde ao número total de sequências representativas desses *clusters*.

	Bibliotecas		
	<i>B. xylophilus</i> (fungo)	<i>B. mucronatus</i> (fungo)	Partilhada
# <i>Clusters</i> específicos	6.185	2.561	7.885
# Sequências específicas anotadas	2.986	769	5.903
% de anotação das sequências específicas	48%	30%	75%

A análise anterior gerou *clusters* baseados em homologia de aminoácidos. No entanto, e dado que os transcritos podem não corresponder à sequência completa do mRNA e dois transcritos da mesma proteína poderem estar em *clusters* diferentes, foi efetuada uma análise adicional através da anotação funcional dos transcritos. As sequências dos conjuntos identificados foram analisadas de acordo com a sua função identificada como domínio proteico (InterPro). Os resultados da análise destes termos são apresentados na Tabela 13. Os termos foram comparados entre os conjuntos de sequências e foram identificadas as anotações exclusivas de cada grupo. Parte das anotações presentes no conjunto de sequências específicas de *B. xylophilus*, correspondente a 26% destas, não teve correspondência nas anotações das sequências de *B. mucronatus*. Em *B. mucronatus* este valor correspondeu a 8%. Estes resultados

sugerem, em concordância com os resultados apresentados na Tabela 13, que o transcrito de *B. xylophilus* apresenta diferenças em relação ao de *B. mucronatus* e que as nossas abordagens permitem a identificação de sequências que potencialmente contribuem para esta variedade. O interesse nas anotações funcionais exclusivas de *B. xylophilus* determinaram a análise manual dos 406 termos InterPro de forma a identificar potenciais efetores no parasitismo do nemátode, segundo o conhecimento atual da DMP.

Tabela 13 - Anotação segundo termos InterPro dos conjuntos de sequências de interesse obtidas na abordagem de transcritômica comparativa integrada com Myrna. Os resultados da anotação obtida pelas sequências nos transcritos originais pelo pipeline de processamento das *reads* foram analisados e comparados. Assim, foram identificados os termos InterPro apenas anotados em sequências específicas de *B. xylophilus*, em sequências específicas de *B. mucronatus* e pelas sequências representativas dos *clusters* constituídos por sequências provenientes de ambos os organismos.

	Bibliotecas		
	<i>B. xylophilus</i> (fungo)	<i>B. mucronatus</i> (fungo)	Partilhada
# Termos InterPro anotados	1.569	520	3.578
# Termos InterPro específicos	406	44	2.298

Das anotações InterPro identificadas foram selecionados quatro grandes grupos de interesse: recetores acoplados à proteína G (GPCR), metabolismo de ácidos gordos, resposta a estímulos e sistema nervoso (Material suplementar 2). A seleção destes grupos consistiu na potencialidade de serem importantes no parasitismo do NMP e, consequentemente, permitirem a identificação de alvos para análise da expressão diferencial entre as amostras em estudo. Os genes identificados poderão codificar proteínas com potencialidade de possuírem uma ação efetiva no mecanismo molecular de patogenicidade.

Os GPCR estão estritamente associados a funções no sistema nervoso, no entanto a quantidade de anotações InterPro associadas a estes recetores revela que o *B. xylophilus* pode apresentar uma bateria de genes mais completa do que *B. mucronatus*. Esta especificidade no NMP pode estar associada a importantes processos biológicos no parasitismo como a regulação do desenvolvimento do nemátode, identificação de sinais

químicos exógenos e armazenamento de energia sob a forma de ácidos gordos (Tabela Suplementar 2).

As anotações associadas ao sistema nervoso do nemátode foram diferenciadas dos GPCR na medida em que identificam um processo biológico importante nos nemátodes: o metabolismo do colesterol. Este lípido é muito importante no desenvolvimento do tecido cerebral do nemátode e determina a entrada do nemátode na fase JIII, consoante as condições onde se encontra. A exploração do sistema nervoso de *B. xylophilus* foi descrita em 2011²¹, sendo identificados alguns genes importantes no desenvolvimento do nemátode e, conseqüentemente, com potencialidade de constituírem alvos de controlo do NMP.

O metabolismo de ácidos gordos é um processo pelo qual os nemátodes sobrevivem em condições de stress, experienciadas, por exemplo, durante o parasitismo de plantas. Com maior importância para as etapas larvais de sobrevivência (JIII e JIV), também os adultos dependem das reservas de ácidos gordos para a indução do parasitismo. Um mecanismo utilizado por nemátodes parasitas de plantas para obtenção de fontes de energia consiste na absorção de ácidos gordos naturais do organismo hospedeiro¹¹⁰.

A resposta a estímulos é um dos processos melhor descritos no mecanismo de patogenicidade de *B. xylophilus*^{21,137}. A maioria das anotações funcionais identificadas está relacionada com a defesa do nemátode à toxicidade de ROS, estando vários genes já descritos na literatura pertencentes a este mecanismo de defesa do nemátode, como catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase (Tabela 1). Interessantemente, foi identificada uma anotação InterPro (IPR005708) correspondente à proteína homogentisato dioxigenase (HGD) (Material suplementar 2). Existem evidências que o homogentisato pode exercer funções de sequestração de ROS e inibição de apoptose celular induzida por H₂O₂^{138,139}, sendo pouco conhecido este potencial mecanismo de defesa em nemátodes parasitas de plantas.

Uma análise adicional consistiu na comparação por BLASTP das sequências de aminoácidos identificadas como específicas de *B. xylophilus* contra a base de dados de proteínas em *C. elegans* depositada no Wormbase¹²⁸. Apenas foram consideradas as sequências anotadas (2.986 sequências), permitindo o acesso a informação biológica sobre as sequências exclusivas de *B. xylophilus*. Estratégias de comparação entre nemátodes parasitas face a *C. elegans* visando identificação de homologias ou divergências entre os genomas são largamente utilizadas atualmente²¹. Foram

identificados 553 (19%) transcritos específicos de NMP face a *C. elegans*. Este resultado representa uma validação da abordagem de transcriptômica comparativa a partir dos *clusters*, na medida em que após a submissão dos filtros visando a identificação de sequências específicas de *B. xylophilus*, a informação filtrada continua com a potencialidade de representar características genéticas deste nemátode. Esta análise revelou-se útil na identificação de sequências exclusivas de *B. xylophilus* face a *C. elegans* e *B. mucronatus*, representando um conjunto de genes com potencial interesse no parasitismo. As sequências identificadas não foram analisadas no âmbito deste trabalho, constituindo uma base de dados para futuros estudos.

Os transcritos em estudo foram anotados funcionalmente segundo os termos KO e analisadas as contribuições de anotações específicas de *B. xylophilus*, *B. mucronatus* e comuns entre eles em cada via metabólica descrita no KEGG. Os níveis de anotação de cada conjunto foram de 30, 27 e 43% para as sequências específicas de *B. xylophilus*, específicas de *B. mucronatus* e partilhadas por ambos os organismos, respetivamente. No grupo de sequências específicas de *B. xylophilus* foram anotados 1.197 termos KO, sendo identificados 568 como exclusivos. Os resultados revelaram o grau de exclusividade do NMP em cada via metabólica KEGG e, adicionalmente, face a *B. mucronatus*. Foram identificadas as vias metabólicas em mais de 25% de anotações KOs específicas pertenceram a *B. xylophilus*. Da sua análise manual resultou a seleção de 15 vias metabólicas de maior interesse consoante a respetiva distribuição das anotações KOs específicas ao longo da via metabólica (Tabela 14). Estas apresentaram uma distribuição espacial das anotações sequencial ou parcialmente sequencial, como o exemplo da via do metabolismo do homogentisato apresentado na Figura 10, evidenciando a possibilidade de integrarem uma diferença metabólica em *B. xylophilus*.

Tabela 14 - Representação das vias metabólicas KEGG de interesse em *B. xylophilus*. O número total de anotações em cada via metabólica foi comparado com o número de anotações exclusivamente obtidas por sequências específicas de *B. xylophilus*. Este último dado foi comparado com o número total de anotações específicas obtidas pelos 3 grupos. As vias metabólicas em análise são identificadas numericamente pelo número do mapa metabólico na base de dados KEGG. Wnt: “wingless-type MMTV integration site family”

Vias metabólicas	# Total de KOs anotados	# KOs de <i>B. xylophilus</i>	# KOs específicos	% KOs específicos
00061 Biossíntese de ácidos gordos	10	5	1	100%
00100 Biossíntese de esteroides	4	2	2	50%
00350 Metabolismo da tirosina	20	9	3	38%
00510 Biossíntese de N-glicanos	33	13	6	35%
00531 Degradação de glicosaminoglicanos	4	3	2	100%
00627 Degradação de aminobenzoatos	9	4	2	40%
00643 Degradação de estireno	6	5	4	100%
02010 Transportadores ABC	16	6	3	30%
04310 Via de sinalização Wnt	46	18	11	37%
04020 Via de sinalização do cálcio	27	14	10	56%
04080 Interação de recetores ligandos neuroativos	12	8	8	80%
04974 Digestão e absorção de proteínas	17	6	3	38%
04975 Digestão e absorção de lípidos	8	4	2	50%
04724 Sinapses glutamínérgicas	21	9	7	44%
04725 Sinapses colinérgicas	23	9	7	37%

A estratégia da anotação contra a base de dados KEGG permitiu a identificação de vias metabólicas associadas a processos biológicos com interesse na elucidação do mecanismo de patogenicidade de *B. xylophilus* (Tabela 14). As vias metabólicas identificadas constituem um resultado interessante na medida em que, para além de estarem relacionadas com processos biológicos importantes no parasitismo do NMP, apresentam níveis de exclusividade em sequências específicas de *B. xylophilus*

consideráveis. São vários os processos biológicos nos quais *B. xylophilus* apresenta exclusividade de transcritos nos resultados da estratégia utilizada.

A via metabólica “Biossíntese de ácidos gordos” poderá estar relacionada com o metabolismo dos ácidos gordos, quer a nível de absorção, síntese ou degradação, o qual é de extrema importância para a sobrevivência de nemátodes parasitas nas plantas hospedeiras¹¹⁰. Foram identificados transcritos com anotações específicas em vias metabólicas com base em glicanos, os quais representam um dos níveis de maior interação entre nemátodes e plantas. Este grupo de anotações poderá revelar interações de efetores presentes em secreções de *B. xylophilus* que atuem sobre os glicanos constituintes da parede celular e outros tecidos da planta, nomeadamente a nível da sua degradação (via metabólica “Degradação de glicosaminoglicanos”). As anotações potencialmente envolvidas no sistema nervoso (“Interação de recetores ligandos neuroativos”, “Sinapses glutamínérgicas” e “Sinapses colinérgicas”) e na sinalização molecular (“Via de sinalização Wnt” e “Via de sinalização do cálcio”) representam um grupo de grande importância mas cujo conhecimento ainda é reduzido. Possíveis diferenças moleculares ao nível destes processos biológicos poderão permitir ao NMP um mecanismo de patogenicidade mais efetivo que o *B. mucronatus*²¹. Foram também identificadas vias metabólicas com resultados interessantes que estão envolvidas em processos já conhecidos em *B. xylophilus* como a resposta ao stress oxidativo, representada pela via metabólica dos transportadores ABC. Yan e colaboradores⁴² apresentaram a anotação detalhada deste grupo de proteínas no transcrito de *B. xylophilus*, demonstrando uma grande variedade de transportadores importantes no transporte membranar, quer de produtos metabólicos como os gerados durante o metabolismo de destoxificação¹⁴⁰. Muitos dos resultados estão de acordo com os obtidos nos resultados na análise das anotações InterPro, apresentados no Material suplementar 2. A concordância obtida a nível de conclusões biológicas revela a confiança em ambas as estratégias e nos resultados obtidos, identificando os processos biológicos discutidos como potencialmente envolvidos na efetiva capacidade de *B. xylophilus* induzir a DMP e *B. mucronatus* não representar esse perigo.

A via do metabolismo da tirosina foi analisada com maior detalhe pela relação das anotações KO obtidas, face à análise de anotação por InterPro. Também a abordagem do KEGG identificou o metabolismo do homogentisato como diferencialmente ativo em *B. xylophilus*. As enzimas envolvidas neste processo biológico são a 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (4HPPD), homogentisato

dioxigenase (HGD), maleilacetoacetato isomerase (MAI) e fumarilacetoacetato hidrolase (FAH)¹⁴¹. No mapa da via metabólica estas correspondem às anotações EC 1.13.11.27, 1.13.11.5, 5.2.1.2 e 3.7.1.2, respectivamente (Figura 10). A Figura 10 apresenta parte da via 00350 Metabolismo da tirosina, onde estão apresentadas anotações KO referentes às sequências específicas de *B. xylophilus*, sendo evidente a distribuição das anotações identificadas no metabolismo do homogentisato.

A comparação das anotações na via de metabolismo do homogentisato apenas detetou as enzimas 4HPPD e MAI expressas *B. mucronatus*. As diferenças de expressão nos genes desta via nos vários transcritomas foram exploradas por RT-qPCR (Figura 13).

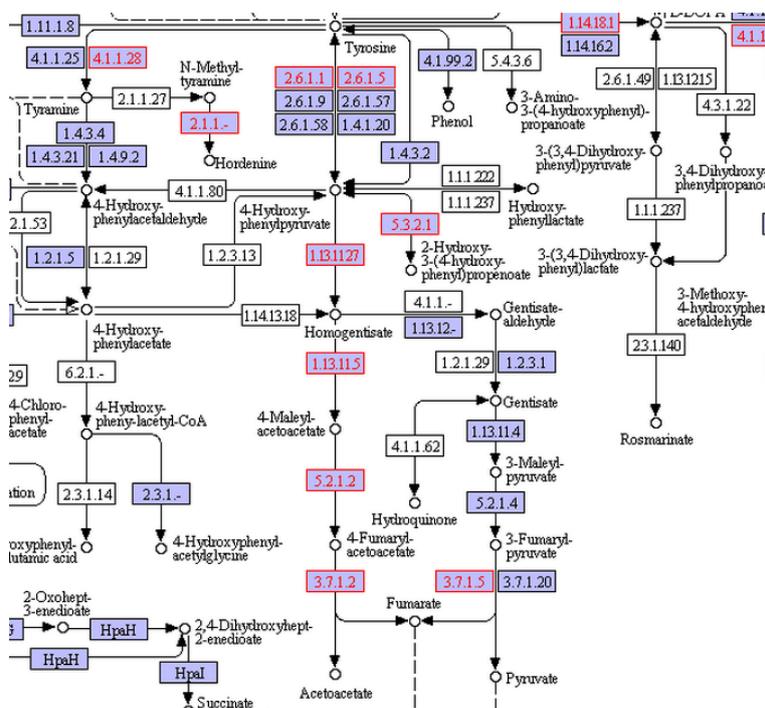


Figura 10 - Representação espacial de anotações KO obtidas por sequências específicas de *B. xylophilus* na via do metabolismo da tirosina, referente ao metabolismo do homogentisato. Estão identificadas a vermelho as enzimas 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (EC 1.13.11.27), homogentisato dioxigenase (EC 1.13.11.5), maleilacetoacetato isomerase (EC 5.2.1.2) e fumarilacetoacetato hidrolase (EC 3.7.1.2).

6 Análise final segundo Myrna

De forma a fazer a ponte entre os resultados obtidos na comparação dos transcritomas de *B. xylophilus* e *B. mucronatus* e completar toda a análise comparativa entre as cinco amostras em estudo, a estratégia seguinte consistiu na análise dos genes diferencialmente expressos entre os transcritomas de *B. xylophilus* crescido em planta.

Os genes identificados pelo Myrna como diferencialmente expressos entre os transcritomas de *B. xylophilus* crescidos em planta compreendem um ponto de partida importante para identificação de efetores no parasitismo do nemátode. Os genes com diferente expressão podem revelar interações específicas que os diferentes estágios de nemátodes estabelecem com a planta hospedeira e elucidar o mecanismo de patogenicidade do NMP. Adicionalmente, o nível de expressão dos genes identificados poderá ser comparado com os obtidos nos transcritomas de *B. xylophilus* e *B. mucronatus* crescidos em fungo, completando todas as combinações de transcritômica comparativa.

A montagem conjunta das *reads* geradas na sequenciação dos transcritomas dos nemátodes crescidos em planta (necessária para a ferramenta Myrna) gerou uma biblioteca constituída por 15.461 transcritos. Destes, 1.845 genes foram identificados pelo Myrna como diferencialmente expressos segundo um *p-value* de $5e^{-5}$. A percentagem de sequências sem anotação por BLAST foi de 25%, sendo difícil a identificação de que proteína a sequência codificará. Várias estratégias de anotação funcional foram aplicadas a este conjunto de sequências de forma a gerar um conjunto de informação com grande potencialidade biológica. Adicionalmente, o facto de partirmos para as análises posteriores com um grupo de sequências mais reduzido (face aos transcritomas completos) representa uma vantagem para a obtenção de informação biológica mais elucidativa.

Um conjunto de análises foram aplicadas sobre as sequências identificadas pelo Myrna como diferencialmente expressas. As 1.845 sequências foram analisadas segundo a potencialidade das proteínas codificadas serem secretadas para o meio extracelular (presença de peptídio sinal e ausência de domínio transmembranar), tendo sido identificadas 142 sequências potencialmente secretadas pelo nemátode em planta. Este conjunto de genes representa uma bateria de proteínas que provavelmente estarão

associadas a interações diretas com a planta, constituindo um grupo de genes com grande interesse de estudo.

A anotação funcional segundo a ferramenta Merops foi realizada visando a identificação de proteínas com grande interesse no parasitismo de nemátodes parasitas de plantas, as peptidases. A ferramenta permitiu a identificação de 65 sequências anotadas entre 24 famílias de peptidases e 6 de inibidores de peptidases. A família com maior número de sequências anotadas foi a C1A com 7 transcritos (Tabela 15). Segundo a informação depositada no Merops, esta anotação corresponde a um grande conjunto de exopeptidases e algumas endopeptidases, sendo difícil a atribuição de uma anotação individual a um efetor desta família. Um resultado interessante corresponde à identificação de duas famílias de inibidores de peptidases, um grupo de proteínas importantes no mecanismo de parasitismo de nemátodes parasitas de animais¹⁴² e de plantas¹⁴³. As anotações foram inseridas na base de dados de comparação das sequências identificadas por Myrna, incluindo a informação biológica de cada anotação.

Tabela 15 - Identificação de famílias de peptidases e inibidores de peptidases nas sequências identificadas por Myrna. As 1.845 sequências foram submetidas à ferramenta de anotação Merops e foi avaliada a distribuição do número de transcritos nas diferentes anotações.

Anotação	Nome	# Transcritos anotados
Família C1A	Papaína	7
Família A1A	Pepsina A	6
Família I25B	Cistatina A	6
Família I29	Antigénio- α 2 de linfócitos T citotóxicos	6
Família S9X	Prolil oligopeptidase	6
Família C19	Peptidase específica de ubiquitina 14	5
Família S33	Prolil aminopeptidase	5
Família T1A	Componente β do proteossoma de <i>Archaea</i>	5
Família M23B	Lisostafina	4
Família I8	Inibidor de quimotripsina/elastase	3
Família A22B	Peptidase intramembranar 1	2

Tabela 15 - Identificação de famílias de peptidases e inibidores de peptidases nas sequências identificadas por Myrna. As 1.845 sequências foram submetidas à ferramenta de anotação Merops e foi avaliada a distribuição do número de transcritos nas diferentes anotações. (Continuação)

Anotação	Nome	# Transcritos anotados
Família M24X	Metionil aminopeptidase 1	2
Família S1A	Quimotripsina A	2
Família C2A	Calpaína 2	1
Família C13	Legumaína	1
Família I4	Inibidor de peptidase α -1	1
Família I32	Survivina	1
Família I51	Inibidor Y de carboxipeptidase de serina	1
Família M1	Aminopeptidase N	1
Família M12B	Adamalisina	1
Família M13	Neprilisina	1
Família M17	Leucil aminopeptidase	1
Família M18	Aminopeptidase I	1
Família M48A	Peptidase Ste24	1
Família M67A	Peptidase PSMD14	1
Família S8B	Kexina	1
Família S9A	Prolil oligopeptidase	1
Família S26A	Peptidase sinal I	1
Família S26B	Componente 21 kDa de sinalase	1
Família S28	Carboxipeptidase Pro-Xaa lisossomal	1

Outras abordagens de anotação funcional foram utilizadas com o propósito de obter mais informações biológicas sobre as sequências em análise. As 1.845 sequências foram anotadas segundo termos de CAZymes através plataforma online CAT. No total, 32 sequências foram anotadas, representando 2% do conjunto de sequências. Este

resultado está de acordo com a evidência que 4% das sequências identificadas pelo Myrna como diferencialmente expressas entre as amostras em estudo obtiveram anotação segundo a ferramenta Merops. O reduzido nível de anotação pode estar relacionado com o facto de 720 sequências (39%) terem sido identificadas pelos software Frame DP e ESTScan, não tendo obtido anotação por BLAST. Numa outra perspectiva, estes resultados podem sugerir que a expressão de efetores conhecidos no parasitismo de *B. xylophilus* como peptidases e CAZymes é mantida entre as diferentes populações de nemátodes estudados em pinheiro, o que revelaria o seu efetivo interesse. As anotações com maior destaque foram as anotadas com 4 transcritos cada, correspondendo às famílias glicosiltransferase 2 (GT2) e carboidratos esterase 10 (CE10), as mais representadas das anotações. A família GT2 poderá estar envolvida no metabolismo de glicanos como a degradação de moléculas provenientes da planta ou síntese de polissacarídeos constituintes da cutícula. Ambas as indicações poderão corresponder a enzimas com potencial envolvimento na DMP. A maioria dos membros da família CE10 são esterases que atuam a nível de substratos não carboidratos, como acetilcolinesterases e esterase de esteróis. Kang e colaboradores⁹⁸ caracterizaram 3 acetilcolinesterases em *B. xylophilus* evidenciando a sua ação na interação com toxinas da reação de defesa da planta como α -pineno e limoneno, para além da sua função sináptica conhecida. Assim, também estas famílias podem compreender sequências com valor biológico de interesse. A estratégia de anotação de CAZymes também apresentou a potencialidade de identificação de efetores em *B. xylophilus*, constituindo uma informação de grande interesse a ser inserida na base de dados.

Como estratégia de anotação funcional e estrutural das sequências identificadas pelo Myrna, estas foram comparadas com transcritos de *C. elegans* depositados na base de dados Wormbase devido à grande quantidade de dados biológicos estudados neste organismo modelo. O acesso à informação biológica de homólogos em *C. elegans* constitui uma fonte de conhecimento integrado nos processos metabólicos do filo *Nematoda*. A informação obtida foi depositada na base de dados constituindo esta a última abordagem de anotação dos transcritos identificados *in silico* diferencialmente expressos.

Tabela 16 - Identificação de famílias de CAZymes nas sequências identificadas por Myrna. As 1.845 sequências foram submetidas à ferramenta de anotação CAT e foi avaliada a distribuição do número de transcritos nas diferentes anotações.

Anotação	Nome	# Transcritos anotados
CE10	Família carbohidrato esterase 10	4
GT2	Família glicosiltransferase 2	4
CE1	Família carbohidrato esterase 1	3
GT1	Família glicosiltransferase 1	3
GT31	Família glicosiltransferase 31	3
GT14	Família glicosiltransferase 14	2
GT66	Família glicosiltransferase 66	2
GH13	Família glicosil hidrolase 13	1
GH18	Família glicosil hidrolase 18	1
GH37	Família glicosil hidrolase 37	1
GH84	Família glicosil hidrolase 84	1
GT7	Família glicosiltransferase 7	1
GT8	Família glicosiltransferase 8	1
GT22	Família glicosiltransferase 22	1
GT47	Família glicosiltransferase 47	1
GT57	Família glicosiltransferase 57	1
GT64	Família glicosiltransferase 64	1
GT92	Família glicosiltransferase 92	1

A mimetização de proteínas homólogas do hospedeiro é um mecanismo de parasitismo em nemátodes parasitas de plantas¹⁴⁴. A abordagem utilizada para a identificação de proteínas expressas envolvidas neste mecanismo identificou 14 sequências (Tabela 17). Estas não obtiveram correspondência de homologia face a nemátodes, mas apenas em plantas. As respectivas proteínas podem, assim, ser

produzidas pelo NMP para a indução do parasitismo durante a DMP, constituindo efetores de grande interesse. Estes genes poderão ter surgido no genoma do nemátode como processo evolutivo, permitindo um mecanismo de patogenicidade mais eficaz. As sequências BxPt17_MFJ_001966 e BxPt17_MFJ_014390 obtiveram como correspondência por homologia na base de dados NCBI nr do reino *Plantae* duas proteínas ribossomais (Tabela 17). As 14 sequências foram ainda submetidas a um BLASTP contra sequências da família *Pine* (taxid:3318) depositadas na base de dados NCBI nr considerando um E-value limite de $1e^{-2}$, não obtendo, no entanto, qualquer correspondência.

De acordo com as características das sequências identificadas, as sequências BxPt17_MFJ_001966 e BxPt17_MFJ_014390 foram selecionadas para validação da expressão diferencial entre as amostras de *B. xylophilus*. Estas corresponderam às sequências com melhor relação entre o E-value obtido nesta abordagem de transcritômica para identificação de proteínas de mimetização e a nível do E-value alcançado na anotação por BLAST, o que representa a anotação com maior confiança. No entanto, não foi possível quantificar experimentalmente os níveis de expressão das proteínas devido à impossibilidade de otimizar a eficiência de amplificação dos genes. A reduzida concentração dos genes resultou na ausência de reprodutibilidade de amplificação entre os padrões de cDNA utilizados.

A base de dados gerada integra a informação do pipeline do processamento das *reads* e das várias estratégias de anotação funcional integradas. Da análise manual de toda a informação integrada resultou a identificação de 14 genes potencialmente codificantes de efetores de *B. xylophilus* (Tabela 18). A expressão diferencial dos genes indicada pelo Myrna foi validada por RT-qPCR.

Tabela 17 - Sequências de potencial mimetização de proteínas em planta identificadas pelo Myrna.
A comparação por homologia das 1.845 sequências identificadas através do BLASTP contra sequências de plantas e nemátodes depositadas na base de dados NCBI nr.

Sequências	Anotação	Organismo	E-value
BxPt17_MFJ_014531	ATP sintase, subunidade β	<i>Medicago truncatula</i>	1,85e-05
BxPt17_MFJ_014353	Hidrolase da parede celular	<i>M. truncatula</i>	1,59e-16
BxPt17_MFJ_014808	Citocromo P450	<i>Nicotiana tabacum</i>	1,24e-05
BxPt17_MFJ_014794	Proteína hipotética	<i>M. truncatula</i>	2,36e-12
BxPt17_MFJ_014474	Proteína hipotética	<i>M. truncatula</i>	6,34e-05
BxPt17_MFJ_014871	Proteína hipotética	<i>M. truncatula</i>	5,98e-14
BxPt17_MFJ_014926	Proteína hipotética	<i>Sorghum bicolor</i>	1,61e-05
BxPt17_MFJ_015187	Proteína hipotética	<i>S. bicolor</i>	3,40e-07
BxPt17_MFJ_014881	Proteína putativa de senescência	<i>Pisum sativum</i>	1,78e-07
BxPt17_MFJ_001966	Proteína ribossomal L11	<i>Zea mays</i>	1,35e-15
BxPt17_MFJ_014390	Proteína ribossomal S10	<i>M. truncatula</i>	1,15e-31
BxPt17_MFJ_014371	Proteína desconhecida	<i>Oryza sativa</i>	3,79e-26
BxPt17_MFJ_014358	Proteína desconhecida	<i>O. sativa</i>	1,20e-21
BxPt17_MFJ_014391	Proteína desconhecida	<i>O. sativa</i>	2,77e-15

7 Quantificação dos níveis de expressão por RT-qPCR

As abordagens discutidas anteriormente originaram a identificação de dois grupos de sequências de interesse: os genes envolvidos na via do homogentisato (4HPPD, HGD, MAI e FAH) e os 14 genes identificados como diferencialmente expressos *in silico* pelo Myrna e selecionados para quantificação da expressão. Estes 14 genes foram identificados com base na análise manual da informação biológica recolhida relativamente às sequências identificadas pelo Myrna (1.845 sequências) e

divididos, como apresentado na Tabela 18, em 8 peptidases, 1 CAZyme e 5 proteínas secretadas.

O leque de genes cuja expressão foi quantificada por RT-qPCR foi estabelecido com a definição de mais um grupo de sequências de interesse apontadas na literatura como envolvidas no mecanismo de parasitismo do NMP (Tabela 18). Neste último grupo foram selecionados genes de duas formas distintas. Os genes correspondentes a uma glutathione peroxidase (GPX), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e uma metaloprotease de zinco, correspondente à enzima 1 de conversão de proteínas farnesiladas (FCE-1) foram selecionados somente com base na anotação obtida por homologia com a base de dados curada Swiss-Prot (obtida no pipeline de processamento das *reads*). Os genes codificantes de proteínas GHF45, GHF16, PEL, VAP 1, VAP 2 e CAL foram identificados com base na homologia apresentada face às respectivas sequências identificadas em *B. xylophilus* e cujo envolvimento foi discutido na introdução do presente trabalho (Tabela 18).

O conjunto de genes cuja expressão relativa foi quantificada é composto por 28 genes e os primers desenhados para a sua amplificação estão presentes em Tabela Suplementar 3. A análise da expressão diferencial *in silico* pelo Myrna foi avaliada em todos os genes. Todas as sequências não identificadas pelo Myrna com uma expressão diferencial de *p-value* inferior a $5e^{-5}$, foram avaliadas segundo um *p-value* máximo de $5e^{-2}$. Isto porque os resultados estatísticos fornecidos pelo REST assumem como *p-value* máximo de 0,05 para uma diferença de expressão relativa estatisticamente significativa. Assim, em termos comparativos, é importante considerar resultados do Myrna cujo *p-value* máximo seja também de 0,05, permitindo a comparação entre os resultados experimentais e *in silico*.

Tabela 18 - Genes selecionados para estudo por RT-qPCR. Os genes estão divididos por conjuntos de acordo com a estratégia através da qual foram identificados e a sua função. Os resultados obtidos na análise estatística (Myrna) estão apresentados para os genes indicados como diferencialmente expressos *in silico* (*p-value* Myrna). A presença de peptídeo sinal e de domínio transmembranar (TM) para identificação de proteínas potencialmente secretadas para o meio extracelular também é apresentada. O E-value corresponde ao obtido por BLAST contra a base e dados curada Swiss-Prot. Por último são apresentados os resultados de duas importantes estratégias na identificação de genes potencialmente envolvidos no parasitismo de *B. xylophilus*, peptidases e inibidores de peptidase (anotação pelo Merops) e CAZymes (anotação pelo CAT). (CRISPLD2: Cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 2).

	ID da sequência	p_value Myrna	Peptídeo sinal	TM	Nome	Anotação pelo Genbank	E-value da anotação	Anotação pelo Merops	Anotação pelo CAT
Metabolismo do Homogentisato	BxPt17_MFJ_004553	-	Não	Não	4HPPD	4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase	0	-	-
	BxPt17_MFJ_001622	5,57e ⁻⁰³	Não	Não	HGD	Homogentisato 1,2-dioxigenase	0	-	-
	BxPt17_MFJ_005446	-	Não	Não	MAI	Maleilacetoacetato isomerase	1,29e ⁻⁴²	-	-
	BxPt17_MFJ_005701	-	Não	Não	FAH	Fumarilacetoacetato	0	-	-
Genes com potencial envolvimento conhecido no parasitismo de <i>B. xylophilus</i>	BmPt2_BxPt17_001012	-	Não	Sim	FCE-1	Enzima 1 de conversão de proteínas farnesiladas	0	M48A/MER002646	-
	BmPt2_BxPt17_006340	1,12e ⁻⁰³	Sim	Não	GPX	Glutathiona peroxidase	0	-	-
	BmPt2_BxPt17_000665	2,55e ⁻⁰²	Não	Não	CAT	Catalase	0	-	-
	BmPt2_BxPt17_008902	4,55e ⁻¹⁵	Não	Não	SOD	Superóxido dismutase	0	-	-
	BxPt17_MFJ_005174	-	Sim	Não	GHF45	β-1,4-endoglucanase	0	-	GH45
	BxPt17_MFJ_004428	-	Não	Não	GHF16	β-1,3-endoglucanase	7,30e ⁻³⁸	-	GH16
	BxPt17_MFJ_004650	-	Sim	Não	PEL	Pectato liase	0	-	PL3
	BxPt17_MFJ_005450	1,76e ⁻⁰²	Sim	Não	Vap 1	CRISPLD2	2,13e ⁻²²	-	CBM50
	BxPt17_MFJ_007345	2,37e ⁻¹²	Sim	Não	VAP 2	Proteína alergénica 3	1,89e ⁻¹⁴	-	CBM50
	BxPt17_MFJ_002078	2,50e ⁻⁰⁵	Sim	Não	CAL	Calreticulina	0	-	-

Tabela 18 - Genes selecionados para estudo por RT-qPCR. Os genes estão divididos por conjuntos de acordo com a estratégia através da qual foram identificados e a sua função. Os resultados obtidos na análise estatística (Myrna) estão apresentados para os genes indicados como diferencialmente expressos *in silico* (*p-value* Myrna). A presença de peptídeo sinal e de domínio transmembranar (TM) para identificação de proteínas potencialmente secretadas para o meio extracelular também é apresentada. O E-value corresponde ao obtido por BLAST contra a base e dados curada Swiss-Prot. Por último são apresentados os resultados de duas importantes estratégias na identificação de genes potencialmente envolvidos no parasitismo de *B. xylophilus*, peptidases e inibidores de peptidase (anotação pelo Merops) e CAZymes (anotação pelo CAT). (CRISPLD2: Cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 2). (Continuação)

	ID da sequência	p_value Myrna	Peptídeo sinal	TM	Nome	Anotação pelo Genbank	E-value da anotação	Anotação pelo Merops	Anotação pelo CAT
Análise final pelo Myrna									
	BxPt17_MFJ_000741	1,16e ⁻⁰⁷	Não	Não	Usp 33	C-terminal ubiquitina hidrolase 33	0	C19/MER122233	
	BxPt17_MFJ_001210	1,28e ⁻¹⁰	Não	Não	USP 14	C-terminal ubiquitina hidrolase 14	0	C19/MER140010	-
	BxPt17_MFJ_002870	1,41e ⁻²⁰	Sim	Não	CAT L	Catepsina F	0	C01A/MER004980 e I29/MER018380	-
	BxPt17_MFJ_003305	3,90e ⁻¹⁷	Não	Não	CAT B	Catepsina B	0	C01A/MER000687	-
Peptidases	BxPt17_MFJ_011568	3,62e ⁻²⁸	Sim	Não	CPI #1	Inibidor de protease cisteínica	1,62e ⁻⁰⁵	I25B/MER018179	-
	BxPt17_MFJ_008038	8,50e ⁻⁰⁸	Sim	Não	CPI 5	Inibidor de protease cisteínica 5	5,81e ⁻⁰⁷	I25B/MER061461	-
	BxPt17_MFJ_004108	4,83e ⁻⁰⁶	Não	Não	SFH _y	S-formilglutamina hidrolase	0	S09X/MER043126	CE1
	BxPt17_MFJ_001047	2,02e ⁻⁴²	Não	Não	ClpX	Protease caseinolítica ClpX	0	-	-
CAZyme	BxPt17_MFJ_001290	1,26e ⁻⁰⁶	Não	Não	TRE	Trealase	0	-	GH37
	BxPt17_MFJ_001359	1,89e ⁻⁰⁹	Sim	Não	PAP#1	Fosfatase ácido roxa #1	2,35e ⁻³³	-	CBM32
Secretadas	BxPt17_MFJ_001376	2,38e ⁻¹⁹	Sim	Não	PAP#2	Fosfatase ácido roxa #2	6,56e ⁻³⁴	-	CBM32
	BxPt17_MFJ_001395	1,16e ⁻⁰⁵	Sim	Não	PAP#3	Fosfatase ácido roxa #3	1,94e ⁻³⁵	-	CBM32

BxPt17_MFJ_006400	7,55e ⁻⁰⁹	Sim	Não	FAR1	Proteína 1 de ligação ao retinol e ácidos gordos	1,26e ⁻⁴⁴	-	-
BxPt17_MFJ_002275	1,10e ⁻⁰⁶	Sim	Não	ERp44	Proteína residente 44 do retículo endoplasmático	0	-	GT90

7.1 Genes com potencial envolvimento conhecido no parasitismo de *B. xylophilus*

Os resultados da expressão génica correspondente aos genes selecionados neste grupo de sequências foram divididos de acordo com o método de seleção.

7.1.1 Genes anotados pela estratégia BLASTP

Os genes com potencialidade de estarem envolvidos no parasitismo do NMP identificados pela anotação contra a base de dados Swiss-Prot foram os únicos cuja expressão foi avaliada em *B. mucronatus*. A análise comparativa do transcrito de *B. mucronatus* foi limitada a estes genes porque com base em estudos anteriores desenvolvidos no laboratório, o nível de similaridade genética entre os organismos *B. xylophilus* e *B. mucronatus* não é suficiente para que seja possível utilizar os mesmos pares de primers para amplificar o mesmo gene em ambos os organismos.

A estratégia utilizada para estudar com maior confiança genes presentes em transcritomas de organismos diferentes mas que codifiquem a mesma proteína consistiu na utilização da biblioteca conjunta das *reads* provenientes da sequenciação dos transcritomas de *B. xylophilus* e *B. mucronatus*. Foram selecionadas sequências com anotações de interesse obtidas por BLASTP contra a base de dados Swiss-Prot e cuja confiança na anotação foi representada por um E-value igual a zero (Tabela 19). Os primers desenhados para cada um destes cinco genes (Tabela Suplementar 3) tiveram por base a sequência com maior homologia detetada em cada um dos transcritomas individuais face à sequência (da biblioteca conjunta) selecionada (Tabela 19). A similaridade das sequências e da respetiva anotação (Tabela 19) garantem a potencialidade de conseguirmos estudar a expressão génica da mesma proteína em organismos diferentes. Esta estratégia, adotada num âmbito exploratório, permitiu a comparação dos níveis de expressão dos quatro genes analisados entre *B. xylophilus* e *B. mucronatus* (Figura 11).

O estudo individual de cada anotação selecionada foi efetuado sobre a respetiva sequência identificada no transcrito de *B. xylophilus* (Tabela 20), apesar

dos genes terem sido selecionados com base na anotação das sequências presentes na biblioteca conjunta.

Tabela 19 – Similaridade entre sequências de interesse detetadas nas bibliotecas de *B. xylophilus* e *B. mucronatus*. As sequências de interesse detetadas na biblioteca conjunta dos dois organismos foram comparadas com os transcriptomas individuais de forma a identificar as sequências nestes que codificavam potencialmente a mesma proteína. As características da sequência como o número de aminoácidos e da anotação obtida por BLASTP contra a base de dados Swiss-Prot permitem a comparação das sequências entre as bibliotecas de *B. xylophilus* (BxPt17), de *B. mucronatus* (BmPt2) e conjunta dos dois organismos (BmPt2_BxPt17).

Gene	Sequência	# Aminoácidos	Anotação	E-value da anotação
	BmPt2_BxPt17_001012	463	Enzima 1 de conversão de proteínas farnesiladas	0
FCE-1	BxPt17_000614	463	Enzima 1 de conversão de proteínas farnesiladas	0
	BmPt2_000191	459	Enzima 1 de conversão de proteínas farnesiladas	0
	BmPt2_BxPt17_006340	228	Glutaciona peroxidase	0
GPX	BxPt17_003736	228	Glutaciona peroxidase	0
	BmPt2_002173	227	Glutaciona peroxidase	0
	BmPt2_BxPt17_008902	166	Superóxido dismutase	0
SOD	BxPt17_005471	157	Superóxido dismutase	0
	BmPt2_003588	162	Superóxido dismutase	0
	BmPt2_BxPt17_000665	502	Catalase	0
CAT	BxPt17_000403	502	Catalase	0
	BmPt2_000598	376	Catalase	0

A estratégia utilizada prende-se com o facto da sequência presente na biblioteca conjunta resultar da assemblagem de *reads* provenientes de diferentes organismos, o que potencia a perda de qualidade da sequência e, conseqüentemente, diminuição de homologia com as sequências depositadas nas bases de dados de anotação. Nesta análise, as sequências presentes no transcriptoma de *B. xylophilus* foram submetidas a um BLASTP contra a base de dados GenBank de NCBI de forma a identificar homólogos em nemátodes e, conseqüentemente, obter informações biológicas relativas a *B. xylophilus* (Tabela 20). Estas sequências foram ainda submetidas por BLASTP

contra a base de dados Wormbase para identificação de homólogos em *C. elegans* e, consequentemente, avaliação da validade das anotações obtidas pelas diferentes estratégias (Tabela 21).

Tabela 20 - Anotação por homologia através de BLASTP contra a base de dados GenBank de NCBI. Os resultados das três correspondências com maior homologia indicam o gene anotado e o respectivo organismo, assim como o ID do gene no GenBank. Os resultados dos alinhamentos mostram o grau de homologia entre as sequências alinhadas.

Gene	ID da sequência	Descrição da correspondência	Organismo	Cobertura da sequência	E-value	Identidade máxima	ID GenBank
GPX	BxPt17_003736	Glutaciona peroxidase	<i>Ditylenchus destructor</i>	95%	1,00e ⁻¹³⁹	84%	AFJ15101.1
		Glutaciona peroxidase	<i>Haemonchus contortus</i>	89%	3,00e ⁻¹²⁵	82%	AAT28332.1
		Glutaciona peroxidase	<i>Brugia pahangi</i>	98%	1,00e ⁻⁹³	54%	CAA48882.1
SOD	BxPt17_005471	Superóxido dismutase Cu/Zn-citoplasmática	<i>D. destructor</i>	100%	1,00e ⁻⁷⁴	70%	AGI95994.1
		Superóxido dismutase	<i>Ascaris suum</i>	99%	1,00e ⁻⁷²	68%	ERG80881.1
		Superóxido dismutase 1	<i>C. elegans</i>	100	2,00e ⁻⁷⁰	68%	NP_001021956.1
CAT	BxPt17_000403	Catalase	<i>D. destructor</i>	99%	0.0	69%	AFJ15102.1
		Catalase	<i>H. contortus</i>	96%	0.0	70%	AAT28330.1
		Catalase	<i>A. suum</i>	97%	0.0	68%	P90682.2
FCE-1	BxPt17_000614	Peptidase da família M48	<i>Brugia malayi</i>	96%	2,00e ⁻¹⁶⁶	54%	XP_001895892.1
		Proteína contendo o domínio de peptidase M48	<i>H. contortus</i>	98%	9,00e ⁻¹⁶⁶	55%	CDJ82575.1
		Proteína CBR-FCE-1	<i>C. briggsae</i>	98%	5,00e ⁻¹⁵⁶	51%	XP_002639257.1

Tabela 21 - Anotação das sequências de interesse por homologia com *C. elegans*. Os resultados obtidos da anotação por BLASTP contra sequências de *C. elegans* depositadas na base de dados Wormbase com a indicação do respectivo gene homólogo pertencente ao nemátode utilizado como organismo modelo.

	Transcrito Wormbase	Gene	E-value
BxPt17_003736	C11E4.1	gpx-5	1,00e ⁻⁹⁹
BxPt17_005471	C15F1.7a	sod-1	1,00e ⁻⁵⁸
BxPt17_000403	Y54G11A.5	ctl-2	0.0
BxPt17_000614	C04F12.10	fce-1	1,00e ⁻¹¹⁸

Os resultados da expressão relativa apresentados na Figura 11 mostram que a estratégia utilizada permitiu a obtenção de sequências de transcritos efetivamente presentes no material genético recolhido a partir dos nemátodes. Foi possível a amplificação, por PCR, dos genes de interesse através de primers desenhados com base na informação das sequências obtidas pela sequenciação do cDNA sintetizado. É assim validada a estratégia pela qual foram gerados todos os dados da sequenciação, desde a extração do RNA total até à montagem dos contigs. Estes resultados garantem confiança que estamos a estudar realmente a informação genética que os organismos expressam.

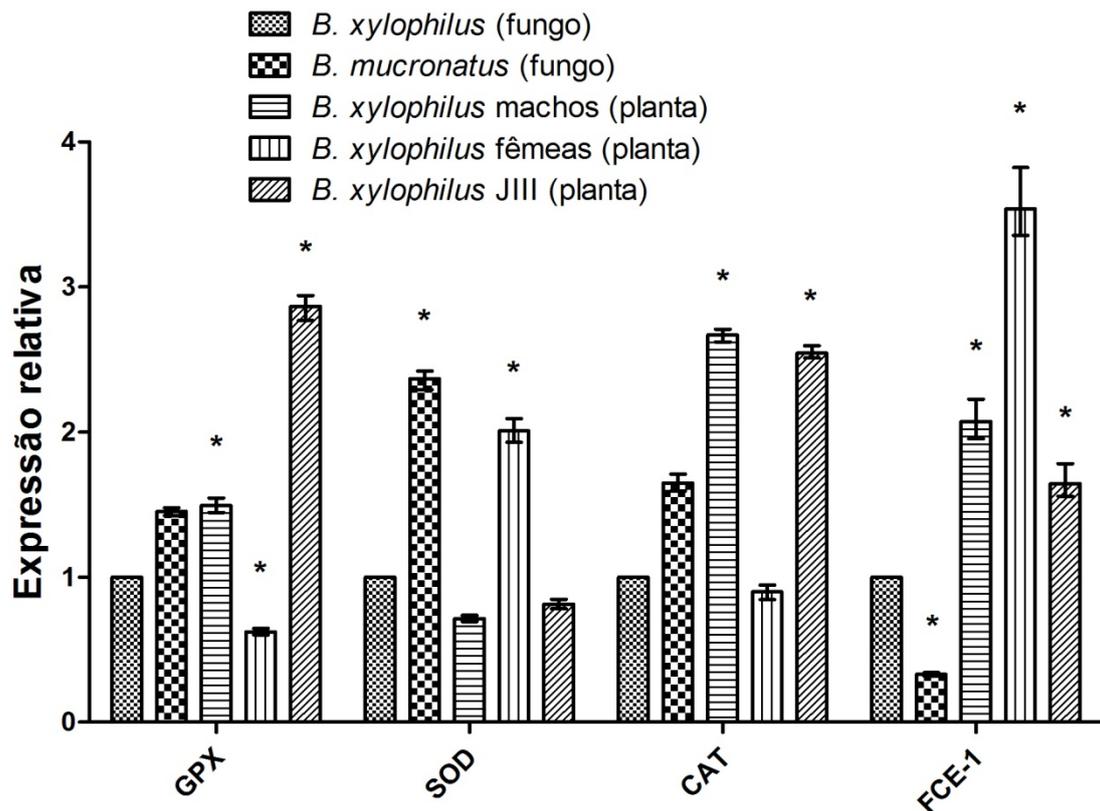


Figura 11 - Resultados de RT-qPCR dos genes identificados através da anotação contra a base de dados Swiss-Prot. A expressão dos genes glutationa peroxidase (GPX), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e enzima 1 de conversão de proteínas farnesiladas (FCE-1) é mostrada relativamente à amostra calibradora, *B. xylophilus* crescido em fungo. Os dados estão apresentados na forma de média±limites, com n=3 a nível de poço em cada placa submetida a real time PCR. * significa uma expressão diferencial com *p-value* < 0,05, determinada pelo REST. Para cada gene a expressão foi determinada contra o calibrador interno proteína 42 de controlo da divisão celular.

7.1.1.1 Enzimas de destoxificação

As proteínas glutationa peroxidase, superóxido dismutase e catalase foram selecionadas de acordo com o seu envolvimento da destoxificação de ROS em *B. xylophilus* (Tabela 1). Estes metabolitos tóxicos constituem uma das respostas mais imediatas da planta a infeções¹⁴⁵, nomeadamente perante nemátodes endoparasitas de plantas¹⁴⁶ como *B. xylophilus*. As três enzimas são produzidas por nemátodes como garantia de tolerância e destoxificação para com as ROS⁸⁷. Como os nemátodes parasitas de plantas são organismos aeróbicos, estes possuem mecanismos para o metabolismo das ROS endógenos e exógenos. De forma geral considera-se que o anião superóxido (O_2^-) é convertido a H_2O_2 pela superóxido dismutase, sendo o peróxido de hidrogénio posteriormente removido por enzimas como peroxirredoxinas e catalases. As

glutathiona peroxidases degradam peróxidos celulares formados sob a ação de ROS¹⁴⁷. A ação conjunta destas 3 enzimas é, assim, de extrema importância para a limitação do efeito oxidativo das ROS produzidas pela planta sobre os nemátodes, assim como, das ROS endógenas produzidas em resposta ao stress oxidativo encontrado na planta.

A presença de enzimas de destoxificação das ROS foi previamente reportada em *B. xylophilus*⁸⁶. No entanto, até ao momento, do nosso conhecimento, não existem referências quanto ao estudo da expressão destes genes em *B. xylophilus* nem quanto à sua presença em *B. mucronatus*.

7.1.1.1.1 Glutathiona Peroxidase

A sequência de ID BxPt17_003736 (Tabela 19) foi anotada por homologia como potencialmente codificante de uma GPX do nemátode parasita de plantas *D. destructor* (Tabela 20). A segunda melhor correspondência obtida consistiu numa GPX da espécie *H. contortus*, um nemátode parasita de ruminantes, cujo ID de acesso da biblioteca nr NCBI é AAT28332 (Tabela 20). O alinhamento das sequências em 89% do tamanho da GPX identificada obteve um E-value de $3e^{-125}$. A pesquisa desta sequência na base de dados Wormbase revelou como melhor correspondência de homologia uma GPX5 de *C. elegans* com um E-value de $1e^{-99}$ (Tabela 21). Kikuchi e colaboradores⁸⁶ identificaram um transcrito cuja anotação pelo Wormbase foi precisamente a mesma sequência que obtida na anotação da GPX identificada neste estudo. Este resultado revela a qualidade e confiança nos dados obtidos pela sequenciação dos cDNA das amostras em estudo.

A proteína GPX em *H. contortus*, foi clonada e a sua função caracterizada¹⁴⁸. De acordo com as características da sequência em aminoácidos, nomeadamente a presença de uma cisteína no local ativo ao invés de uma selenocisteína, a proteína codificada foi caracterizada como uma GPX independente de selénio (NS-GPX). A presença de uma cisteína no local ativo da GPX de *B. xylophilus* identificou este transcrito como codificante de uma NS-GPX. Desta forma é possível considerar que esta enzima possa estar envolvida no mecanismo de defesa do nemátode contra o stress oxidativo.

A primeira evidência de uma NS-GPX em nemátodes foi reportada em *B. pahangi*, um nemátode parasita de ruminantes¹⁴⁹, cujo ID na base de dados NCBI é CAA48882. O alinhamento da sua sequência em aminoácidos para com a GPX identificada obteve um E-value de $1e^{-93}$ (Tabela 20) e permitiu comprovar a

conservação dos locais ativos entre as proteínas. As NS-GPXs estão maioritariamente relacionadas com as GPX de plasma ou extracelulares¹⁵⁰ e os autores do estudo no qual foi identificada a GPX de *B. pahangi*¹⁴⁹ comprovaram que a enzima é secretada para o meio extracelular. Também a sequência da GPX detetada apresenta potencialidade de ser secretada para o meio extracelular, tendo em conta a presença de um peptídeo sinal e ausência de TM (Tabela 18).

As NS-GPX são maioritariamente GPX de hidroperóxidos de fosfolípidos, possuindo baixa afinidade para com a glutathione e utilizando a tioredoxina como substrato para o fornecimento de eletrões durante a sua atividade catalítica¹⁵¹. No entanto, a NS-GPX de *B. pahangi*, à semelhança da respetiva enzima em outros nemátodes, constitui um grupo particular dentro das NS-GPX. Isto porque, para além de apresentar baixa afinidade pela glutathione e, subsequente, baixa atividade de glutathione peroxidase^{152,153}, também apresenta baixa atividade de tioredoxina peroxidase¹⁵³.

As evidências funcionais da NS-GPX de nemátodes remetem esta proteína para um grupo de NS-GPX com características muito peculiares, cuja atividade funcional ainda está por esclarecer. Este esclarecimento torna-se ainda mais difícil considerando a evidência de que NS-GPXs são expressas em diferentes localizações, apresentando diferentes isoformas consoante a respetiva localização¹⁵¹. A isoforma de GPX secretada por *B. pahangi* apresentou grande afinidade por peróxidos de ácidos gordos¹⁵³. Estas evidências em conjunto com a demonstração de que esta GPX inibiu a peroxidação lipídica *in vitro* em membranas microssomais de fígado de rato¹⁵⁴, fundamentou a sugestão de que esta enzima poderá estar envolvida na reparação de danos oxidativos nas membranas.

Estudos catalíticos sobre uma NS-GPX do nemátode parasita de animais *Dirofilaria immitis*, cujo ESTs foram obtidos recorrendo a primers correspondentes às extremidades 5' e 3' da sequência da NS-GPX de *B. pahangi*, revelaram que a enzima continha baixa atividade perante o peróxido de hidrogénio e uma grande atividade utilizando hidroperóxidos de ácido linoleico como substrato¹⁵². Estes hidroperóxidos de ácidos gordos estão envolvidos numa das mais importantes vias de sinalização do sistema de defesa em plantas, a via da lipoxigenase^{155,156}. A produção de hidroperóxidos de ácidos gordos e a sua consequente ação induzem a produção de proteínas de defesa, aumentando a intensidade da resposta de defesa da planta¹⁵⁶. A via da lipoxigenase em plantas é análoga à mesma via em animais¹⁵⁶, o que contribui para a potencial

semelhança de algumas características nos mecanismos de patogenicidade de nemátodes parasitas de plantas e animais.

Quer em nemátodes parasitas de animais¹⁴⁹ como de plantas¹⁵⁷, a isoforma de GPX secretada estava exclusivamente na hipoderme. A importância das interações diretas parasita-hospedeiro a nível da superfície de contacto entre o parasita e as células do hospedeiro suporta a sugestão de que esta GPX poderá possuir um papel importante na proteção direta do nemátode às respostas de defesa da planta^{157,158}. Considerando o local de atuação da enzima assim como as evidências funcionais, foi postulado que a degradação local de hidroperóxidos de lípidos produzidos pela planta poderá evitar uma reação de defesa alargada.

Numa outra perspectiva, uma possível função para a GPX, de acordo com evidências da presença desta enzima em nemátodes não parasitas como *C. elegans*, consiste na catálise de formação das ligações entre tirosinas em cuticulinas^{151,157}. Estas proteínas constituem a estrutura do córtex externo da cutícula¹⁴⁹.

A potencialidade da GPX estar diretamente envolvida no mecanismo de patogenicidade do NMP revela o interesse em estudar os níveis de expressão relativa entre as amostras em estudo. Tal como sugerido por Herbette e colaboradores, o estudo da expressão desta enzima em diferentes condições e localizações subcelulares poderá clarificar a sua função específica, bem como a respetiva interação com o hospedeiro¹⁵¹. Apesar das evidências de que a sequência codifica uma GPX secretada e potencialmente envolvida no parasitismo, serão necessários estudos mais extensos para confirmar a sua presença na hipoderme do NMP, assim como, a sua atividade funcional.

7.1.1.1.2 Superóxido dismutase

A sequência detetada neste estudo, de ID BxPt17_005471, foi anotada por homologia como potencialmente codificante de uma superóxido dismutase do nemátode *D. destructor* (Tabela 20). Já a segunda correspondência obtida (Tabela 20) foi concordante com a anotação obtida pelo BLASTP com a base de dados Wormbase (Tabela 21), identificando a SOD identificada como a SOD-1 de *C. elegans*, caracterizada como uma SOD intracelular de cobre e zinco¹⁵⁹. A anotação obtida pelas bases de dados Swiss-Prot e Wormbase obtiveram um E-value de $2e^{-70}$ e $1e^{-58}$, respetivamente (Tabela 20 e Tabela 21). A anotação obtida pela base de dados do Wormbase correspondeu ao gene SOD-1, cujo ID é C15F1.7a. Kikuchi e colaboradores

identificaram um transcrito de *B. xylophilus* cuja anotação pelo Wormbase foi exatamente a sequência correspondente a este ID⁸⁶.

O facto de a anotação ter identificado por homologia uma proteína intracelular é concordante com os resultados obtidos pela previsão do peptídeo sinal no SinalP (Tabela 18), nas quais se confirmou a ausência deste local. Estes resultados potenciam a conclusão que a SOD detetada neste estudo codifica uma SOD citoplasmática.

A SOD-1 em *C. elegans* apresentou a função normal de proteção celular face ao stress oxidativo, constituindo um importante papel na sobrevivência e tempo de vida no nemátode¹⁶⁰. Muitos nemátodes parasitas apresentam atividade de SOD-1, quer parasitas de animais¹⁶¹, assim como parasitas de plantas^{147,162}. Estudos incidentes na função e evolução das SODs concluíram que estas enzimas em nemátodes parasitas de animais são análogas às respetivas SODs de outros organismos, evidenciado a conservação e importância da sua função. Apesar da função desta enzima não estar totalmente esclarecida em nemátodes parasitas de plantas, assim como, a sua possível interação com o hospedeiro¹⁶², sugere-se que exerça a sua conservada função de destoxificação face ao stress oxidativo característico a que os nemátodes estão expostos durante o parasitismo^{43,150}. Assim, esta enzima integra o leque de proteínas com a função de proteção do nemátode face aos mecanismos de defesa da planta.

Apesar do potencial envolvimento desta enzima no mecanismo de defesa de nemátodes parasitas de plantas face a condições de stress oxidativo, conhecimentos importantes como a resposta da expressão desta enzima durante as interações estabelecidas entre o nemátode e a planta precisam de ser avaliados, validados e integrados no conhecimento existente sobre o mecanismo de patogenicidade destes nemátodes.

7.1.1.1.3 Catalase

A sequência de ID BxPt17_000403, detetada no nosso estudo, foi anotada por homologia como potencialmente codificante de uma catalase, cujo primeiro correspondência correspondeu ao nemátode *D. destructor* (Tabela 20). A anotação com genes deste nemátode parasita de plantas é paralela com os outros dois genes de destoxificação. No entanto, a informação disponível sobre a ecologia e o parasitismo deste nemátode é mínima não sendo possível estabelecer uma relação entre as espécies *D. destructor* e *B. xylophilus*. A segunda melhor correspondência obtida consistiu numa

GPX da espécie *H. contortus*, cujo ID de acesso da biblioteca nr NCBI é AAT28332, observando-se o alinhamento das sequências em 96% do tamanho da GPX detetada com um E-value de 0.0 (Tabela 20). A anotação da CAT identificada recorrendo à base de dados Wormbase identificou maior homologia com a CAT-2 de *C. elegans* com um E-value de 0.0 (Tabela 21). A sequência deste transcrito em *C. elegans* foi a melhor homologia de um transcrito de *B. xylophilus* identificada por Kikuchi e colaboradores⁸⁶, revelando a qualidade e confiança nos dados obtidos pela sequenciação dos cDNA das amostras em estudo.

O estudo da proteína em *H. contortus* codificada pela sequência identificada por Bagnall e colaboradores¹⁴⁸ sugeriram a sua localização no citosol, devido à ausência do sinal de direcionamento para peroxissomas no terminal C da sequência de aminoácido, e subsequentemente, função de proteção contra o peróxido de hidrogénio exógeno.

A proteína CAT-2 em *C. elegans* é anotada como uma CAT peroxissomal e está envolvida no desenvolvimento normal do nemátode e o seu silenciamento pode levar à morte prematura do organismo¹⁶³. Foi sugerido que a morte se devia à desregulação da função de controlo dos níveis de ROS celulares.

A conservada função das catalases na destoxificação de peróxido de hidrogénio estabelece esta enzima como uma importante ferramenta de defesa dos nemátodes parasitas de plantas face a condições de stress oxidativo, com especial interesse na planta¹⁵⁸. De forma a estudar e elucidar a sua função durante as interações estabelecidas entre o nemátode e a planta, a sua expressão foi analisada nas amostras em estudo.

7.1.1.1.4 Expressão diferencial do mecanismo de destoxificação

Globalmente, os resultados apresentados na Figura 11 revelam diferenças de ativação dos genes potencialmente envolvidos no mecanismo de destoxificação dos nemátodes em estudo. Comparando a ativação do mecanismo entre *B. xylophilus* e *B. mucronatus* crescidos em fungo, apenas a SOD apresentou uma sobre-expressão estatisticamente significativa em *B. mucronatus* (Figura 11). As enzimas CAT e GPX não evidenciaram diferenças de expressão entre os dois organismos. Sendo estas condições as ótimas para o seu desenvolvimento, a ativação destas enzimas não estará associada à resposta perante estímulos externos mas sim ao metabolismo endógeno dos nemátodes. O nível de ativação similar pode sugerir ainda que estamos a avaliar a expressão da mesma enzima, validando a estratégia utilizada para ultrapassar a questão

da utilização de diferentes pares de primers para a amplificação do mesmo gene entre organismos diferentes. Já o resultado da expressão da SOD entre os dois organismos sugere que a enzima possa desempenhar diferentes atividades entre os organismos ou que estes possuam diferenças metabólicas. Estas diferenças podem explicar que quando sujeitos às mesmas condições, *B. mucronatus* produza maior quantidade de aniões superóxido necessitando de uma maior expressão da SOD face a *B. xylophilus*. Estas diferenças metabólicas poderão ser importantes se reproduzidas no pinheiro e, conseqüentemente, na capacidade dos nemátodes induzirem a DMP. A maior necessidade de destoxificação oxidativa poderá constituir um fator de risco para a sobrevivência na árvore em comparação com o NMP. Este resultado é interessante na medida em que diferenças metabólicas entre organismos filogeneticamente próximos podem evidenciar diferentes capacidades de parasitismo.

A comparação dos níveis de expressão dos três genes sob estudo entre as amostras de *B. xylophilus* em planta e *B. xylophilus* crescido em fungo revelou várias diferenças de expressão génica (Figura 11). Nemátodes machos e JIII crescidos em planta apresentaram face a *B. xylophilus* crescido em fungo a sobre-expressão da GPX e da CAT (Figura 11). *B. xylophilus* fêmeas apenas apresentam a sobre-expressão estatisticamente significativa da SOD. Todas as formas de vida de *B. xylophilus* crescidas em planta sobre-expressam pelo menos um dos três genes potencialmente envolvidos na destoxificação oxidativa. Este resultado evidencia que os nemátodes estão sujeitos a uma maior exposição a ROS em pinheiro do que em fungo, ocorrendo no primeiro caso, uma maior necessidade de expressão de enzimas de destoxificação destas moléculas tóxicas. Estes resultados, de uma forma geral, suportam a teoria sobre o aumento da produção de ROS pelas plantas como resposta à infecção do nemátode, possuindo um efeito relevante na sobrevivência e desenvolvimento do nemátode e implicando a ativação de mecanismos de destoxificação.

Os resultados da expressão da GPX em JIII são bastante interessantes na medida em que Kikuchi e colaboradores reportaram que a GPX identificada no seu estudo não era expressa em nemátodes JIV⁸⁶. Tendo em conta a homologia entre a GPX estudada por este grupo e a GPX identificada por nós, estes resultados indicam que esta proteína terá uma função específica em nemátodes JIII, dentro das formas de vida dispersivas do NMP. O facto do JIII se desenvolver em JIV na presença de insetos vetores³² sugere que estes últimos nemátodes alteram o seu metabolismo em função das novas condições experimentadas, que são menos extremas do que em planta. Desta forma, a ativação da

proteína GPX em JIII sugere que esta exerça efetivamente uma ação importante na sobrevivência do nemátode nas condições adversas, não só em JIII mas também em nemátodes adultos. No entanto é de realçar que os dados gerados por Kikuchi e colaboradores⁸⁶ correspondem a um projeto de EST, o qual tem muito menor capacidade de produção de informação genética, em comparação com o procedimento RNAseq utilizado no nosso estudo. Este facto poderá constituir uma limitação na comparação entre os resultados originados por técnicas diferentes.

A sobre-expressão da GPX em JIII face aos estágios adultos pode estar ainda relacionada com a diferente ativação metabólica entre os nemátodes, já que os JIII não se alimentam e poderão possuir os mecanismos de defesa mais ativos em detrimento de vias metabólicas basais²⁹. Larsen¹⁶⁴ estudou a expressão comparativa de enzimas de destoxificação como CAT e SOD entre formas de *C. elegans* dispersivas face a nemátodes adultos, verificando a sobre-expressão das enzimas nos nemátodes juvenis. Este resultado está de acordo com os nossos resultados, revelando que as diferenças de expressão observadas podem-se dever a diferenças metabólicas nas vias de combate ao stress oxidativo existentes entre os nemátodes JIII e adultos. As diferenças metabólicas são suportadas pelas diferenças de adaptação e anatómicas entre os nemátodes JIII e adultos³⁰.

Numa outra perspetiva, a potencial função da GPX na catálise de formação de ligações entre tirosinas em cutículas não se enquadra com os resultados obtidos (Figura 11). Como a formação de cutícula em nemátodes ocorre em 4 momentos, em embrião e no final de cada etapa larval não seria esperado que esta enzima fosse expressa em machos e fêmeas de *B. xylophilus* crescidos em planta, fases do desenvolvimento em que não será necessária a expressão de enzimas intervenientes na formação da cutícula em nemátodes.

Os resultados de expressão nas fêmeas não são tão elucidativos quanto ao envolvimento das enzimas em estudo no mecanismo de destoxificação destes nemátodes. Apenas a SOD está sobre-expressa em *B. xylophilus* fêmeas (Figura 11). Os nemátodes foram extraídos após o aparecimento dos sintomas externos da planta, correspondendo temporalmente com o início da fase avançada da DMP e, conseqüentemente, com diminuição da reação de defesa da árvore⁵³. Esta etapa pode coincidir com uma das fases do parasitismo em que as fêmeas possuem maior segurança para a reprodução, alterando o seu metabolismo ou localizando-se em áreas da planta menos propícias a stresses exógenos. Numa outra perspetiva, as diferenças detetadas na

expressão dos genes em fêmeas poderão sugerir que o mecanismo pelo qual as diferentes formas de vida do nemátode ultrapassam o stress oxidativo é diferente ou que estas estejam sujeitas a diferentes condições de stress na planta. Esta teoria levanta a hipótese dos nemátodes assumirem uma distribuição diferencial ao longo da planta, de acordo com as características metabólicas e, conseqüentemente, estabelecendo interações moleculares com o hospedeiro específicas de acordo com essas características.

7.1.1.2 Metaloprotease de zinco

Os nemátodes parasitas de plantas secretam diferentes proteases, as quais são de extrema importância para um efetivo mecanismo de patogenicidade. A importância das proteases no parasitismo está relacionada com a sua ação na degradação de proteínas presentes na parede celular do hospedeiro de modo a facilitar a migração e alimentação do nemátode, ou até mesmo na degradação de proteínas de defesa da planta^{88,143}.

As proteases suscitam maior interesse em *B. xylophilus* pelo facto de este possuir o maior número de genes de proteases alguma vez descrito num genoma de nemátode²¹. A sugestão dos autores para este facto consiste nas variadas fontes de alimento que o *B. xylophilus* utiliza e a sua difícil digestão, como fungos e plantas, sendo necessário um grande leque de proteases digestivas para um nemátode com o estilo de vida tão peculiar como o NMP.

Kikuchi e colaboradores detetaram que o grupo de proteases com maior representação no genoma de *B. xylophilus* são as metalopeptidases²¹. No entanto, apesar de a sua presença ter sido reportada em outros nemátodes parasitas de plantas¹⁴³, a função das metalopeptidases no mecanismo de patogenicidade destes nemátodes permanece por elucidar⁸⁸.

A sequência de ID BxPt17_000614, detetada no nosso estudo, foi anotada por homologia (BLASTP na base de dados nr do NCBI) como potencialmente codificante de uma enzima 1 de conversão de proteínas farnesiladas (FCE-1), cuja primeira correspondência correspondeu ao nemátode *B. malayi* (Tabela 20). A sequência BmPt2_BxPt17_001012, representativa dos genes codificantes da metaloprotease de zinco em estudo presentes nos dois organismos foi anotada como pertencente à família de peptidases M48A, pelo Merops (Tabela 18). Tal como a anotação obtida contra o Swiss-Prot (Tabela 18), também a anotação MER002646 representa a enzima 1 de

conversão de proteínas farnesiladas, revelando a concordância de diferentes ferramentas de anotação sob a mesma sequência. As anotações obtidas também estão concordantes com o gene homólogo em *C. elegans* detectado na anotação contra a base de dados Wormbase (Tabela 21).

A enzima FCE-1 está associada ao processo de prenilação de proteínas, que consiste na adição de um grupo lipídico como modificação pós-traducional de proteínas. Este processo é importante na maturação e processamento das proteínas, mediando associações proteína-proteína, proteína-membrana e correta localização celular (revisto em ¹⁶⁵).

O processo de prenilação no qual a FCE-1 intervém, inicia-se com a ligação de um radical isoprenóide lipídico com 15 carbonos (grupo farnesil) ou com 20 carbonos (geranilgeranil), através de uma ligação tioéster ao resíduo cisteína constituinte de um motivo CaaX (onde C representa a cisteína, a um resíduo hidrofóbico e X qualquer aminoácido) localizado no C terminal da proteína alvo (Figura 11)¹⁶⁶. A primeira reação do processo de modificação pós-traducional apresentado na Figura 11, visando a ligação do grupo farnesil, é catalisada pela proteína farnesiltransferase (FTase). O tripéptido aaX é removido pela enzima 1 de conversão de Ras (RCE1). Esta enzima atua quer o grupo isoprenóide adicionado seja farnesil ou geranilgeranil. A enzima FCE-1 é ortóloga da RCE1, atuando somente quando o grupo adicionado consiste num grupo farnesil. Daí, as enzimas FCE-1 e RCE1 serem também denominadas de CaaX prenil protease homóloga 1 e CaaX prenil protease homóloga 2, respetivamente¹⁶⁷. O novo C terminal carboxilato é metilado pela enzima isoprenil cisteína carboxil metil transferase (IcmT)¹⁶⁸. Por fim, a proteína prenilada é dirigida para as membranas específicas (revisto em ¹⁶⁹).

Cadiñanos e colaboradores evidenciaram a presença da enzima FCE-1 em *C. elegans* e demonstraram que esta desempenha a mesma função que os homólogos presentes em mamíferos onde a enzima foi extensivamente estudada¹⁷⁰. Várias dezenas de substratos têm sido associados à ação desta enzima em mamíferos, constituindo componentes integrantes de vias de sinalização e controlo de diversas atividades celulares como transporte intracelular de vesículas, adesão celular, endocitose, sinalização de recetores e expressão génica (revisto em ¹⁶⁵).

Os resultados apresentados na Figura 11, apresentam a sobre-expressão estatisticamente significativa da FCE-1 em todas as formas de vida do NMP crescidas em planta. Este resultado revela que a enzima apresenta maior atividade durante o

parasitismo, com especial interesse em nemátodes fêmeas (Figura 11). A elucidação do substrato proteico onde a FCE-1 atua durante a indução do mecanismo de patogenicidade em pinheiro poderá revelar um processo biológico importante na sobrevivência dos nemátodes, em especial atenção das fêmeas. A potencialidade de destabilizar esta forma de vida do NMP possui relevância acrescida, tendo em conta a sua importância na manutenção da população na árvore hospedeira. Adicionalmente, o facto da enzima FCE-1 atuar em proteínas que visam a constituição da membrana citoplasmática e esta constituir um dos principais mecanismos de reconhecimento de sinais externos e, conseqüentemente, mediar respostas celulares suportam o interesse neste gene.

7.1.2 Efeitos conhecidos de *B. xylophilus*

A quantificação dos níveis de expressão de efeitos importantes no parasitismo de *B. xylophilus* descritos na literatura constituiu uma interessante fonte de resultados permitindo a comparação com as características moleculares que foram investigadas. Os resultados dos níveis de expressão obtidos por RT-qPCR estão apresentados na Figura 12.

7.1.2.1. Proteínas degradadoras de parede celular de plantas

7.1.2.1.1. Glicosil hidrolase da família 45

O transcrito BxPt17_MFJ_005174 foi anotado como uma β -1,4-endoglucanase e a anotação obtida pela plataforma de anotação de CAZymes, CAT, foi de GHF45 (Tabela 18). As anotações estão de acordo com a homologia obtida para com a GHF45 identificada em *B. xylophilus* (Tabela 18) por Kikuchi e colaboradores¹⁷¹.

A GHF45 constitui um dos mecanismos mais aceites como constituintes do parasitismo do NMP²¹. Estima-se que a sua função seja de extrema importância para o nemátode na medida em que promove a degradação da celulose⁸⁸. A capacidade do nemátode em invadir as células do hospedeiro permite o acesso aos nutrientes disponíveis no seu interior, assim como, a migração do nemátode ao longo dos tecidos da planta. A grande capacidade de migração do nemátode dentro do hospedeiro é considerada um dos fatores com maior impacto no parasitismo, na medida em que, para

além de promover o acesso a novas fontes de alimento, também permite a fuga à reação de defesa *in loco* da planta⁸⁸. As evidências da secreção desta proteína em *B. xylophilus*¹⁷¹ estão de acordo com a previsão da presença de um peptídeo sinal e ausência de TM na sequência BxPt17_MFJ_005174 (Tabela 18), representando a potencialidade de atuar efetivamente na degradação das paredes celulares.

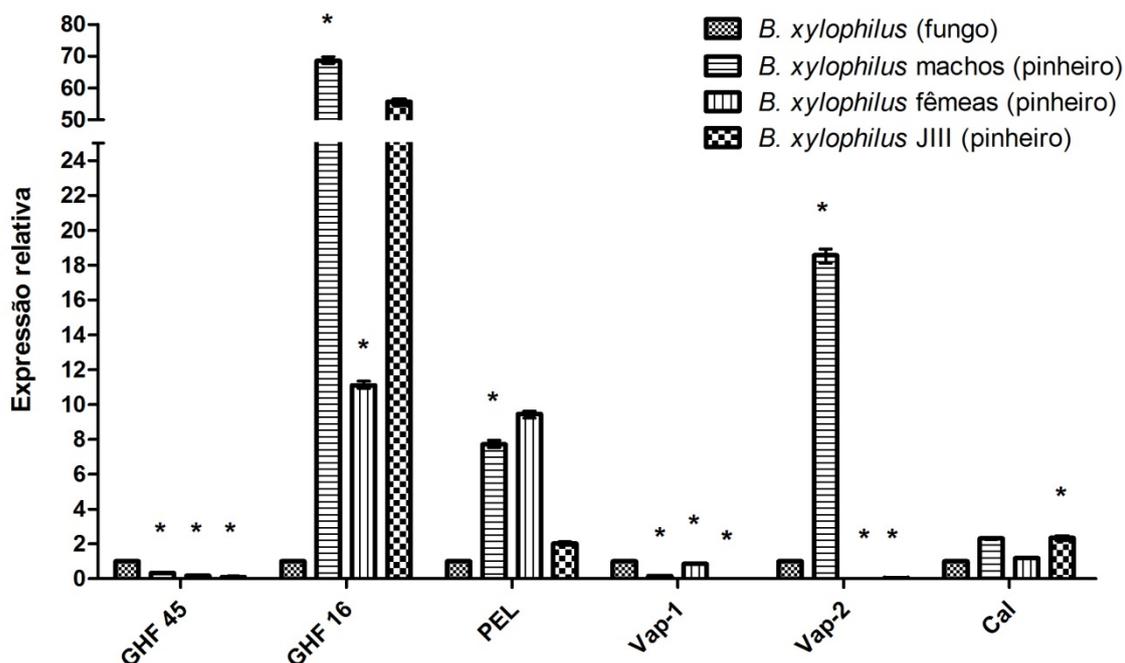


Figura 12 - Resultados de RT-qPCR de genes efetores de *B. xylophilus*. A expressão das enzimas pertencentes à família de glicosil hidrolases 45 e 16 (GHF45 e GHF16, respetivamente), pectato liase (PEL), proteínas alergénicas 1 e 2 (VAP1 e VAP2, respetivamente) e calreticulina (CAL) é mostrada relativamente à amostra calibradora, *B. xylophilus* crescido em fungo. Os dados estão apresentados na forma de média±limites, com n=3 a nível de poço em cada placa submetida a real time PCR. * significa uma expressão diferencial com *p-value* < 0,05, determinada pelo REST Para cada gene a expressão foi determinada contra o calibrador interno proteína 42 de controlo da divisão celular.

Os resultados de RT-qPCR apresentam contudo uma sub-expressão do gene em todas as amostras correspondentes aos nemátodes crescidos em planta (Figura 12). Qiu e colaboradores¹³⁵ observaram uma sub-expressão semelhante das 3 sequências anotadas com atividade de β -1,4-endoglucanase em *B. xylophilus* inoculados em planta face nemátodes inoculados em fungo. Os nemátodes foram inoculados durante 7 dias representando a fase inicial da infeção e todas as 3 sequências apresentaram menor expressão em planta face às condições de micofagia¹³⁵. Neste estudo, os nemátodes

foram recolhidos após o aparecimento dos sintomas externos da doença, o que corresponde a uma etapa de desenvolvimento da doença avançada. Assim, os autores sugeriram a potencial necessidade do NMP em expressar outras enzimas para, por exemplo, degradar ligações mais acessíveis na parede celular das células vegetais. Após a degradação destas ligações, as celulases poderão ser mais ativas para quebrar a celulose¹³⁵. A sub-expressão da GHF45 dos transcritomas de *B. xylophilus* crescido em planta face à população crescida em fungo sugere que esta enzima não está ativa nos nemátodes crescidos em planta, o que pode sugerir uma via alternativa de migração e invasão das células na planta. Os nemátodes foram recolhidos após o aparecimento dos primeiros sintomas externos na planta, o que corresponde sensivelmente à terceira semana após o inóculo dos nemátodes na árvore⁴⁸. Nesta etapa temporal de desenvolvimento da doença inicia-se a dessecação do xilema⁵², representando o ponto de viragem no qual a árvore muito provavelmente já não recupera⁶¹. Aqui, a reação de defesa da árvore é alterada⁶¹ o que poderá desencadear modificações no mecanismo de parasitismo do nemátode. Estas modificações estão de acordo com a evidência do nemátode atingir tecidos, como o câmbio vascular, só acessíveis após a mudança da fase inicial para a fase avançada de desenvolvimento da doença, correspondente à terceira semana de infeção^{48,60}. A sub-expressão da GHF45 pode, desta forma, indicar a existência de mecanismos divergentes ao longo da doença, ajustando-se à debilidade da planta e visando a morte do hospedeiro.

7.1.2.1.1. Glicosil hidrolase da família 16

A GHF 16 cuja expressão relativa foi avaliada por RT-qPCR é codificada pela sequência BxPt17_MFJ_004428 (Tabela 18). Esta sequência foi anotada pelo CAT como uma GHF 16 (Tabela 18) e apresenta grande similaridade com a GHF 16 (Tabela 18) já descrita de *B. xylophilus*⁸⁵. Os autores reportaram que a proteína em *B. xylophilus* é secretada, no entanto a previsão do peptídeo sinal na sequência BxPt17_MFJ_004428 não detetou a presença da respetiva estrutura molecular (Tabela 18). O local do peptídeo sinal previsto na sequência de ID BAE02683 coincidiu numa zona sem homologia entre as duas sequências (resultados não apresentados). Esta diferença poderá explicar a ausência de concordância quando à potencialidade da GHF16 identificada apresentar peptídeo sinal. A inexistência de homologia entre as sequências pode resultar da assemblagem dos contigs no pipeline de processamento das *reads*.

Os resultados de RT-qPCR (Figura 12) da GHF16 indicaram a sobre-expressão do gene em todas as amostras de nemátodes crescidos em planta. O elevado nível de expressão é revelador da ativação desta enzima durante a infecção da planta. Adicionalmente, a sobre-expressão revela que a ação desta proteína não atua somente a nível da degradação de β -1,3-endoglucana das paredes celulares em fungos⁸⁵, mas também possuirá uma ação importante no parasitismo. Kikuchi e colaboradores⁸⁵ verificaram que a enzima clonada hidrolisava preferencialmente laminarina e tinha pouca atividade em β -1,3-1,4-glucana, em liquenana e em beta-glucana de cevada, sugerindo que a GHF16 seria necessária para a alimentação em fungos. A sobre-expressão desta enzima pelo nemátode no interior da árvore indica que o substrato desta enzima deverá ser outra substância que não os componentes da parede celular de fungos. A presença deste grupo de enzimas (GHF16) foi também já detetada no processo invasivo de outros nemátodes parasitas de plantas como *D. destructor*¹⁷², *Acidovorax avenae*¹⁷³ e *P. coffeae*⁸⁸. O elevado nível de sobre-expressão deste transcrito e a sua origem de proveniência bactéria via transferência horizontal de genes tornam este gene um alvo interessante para o controlo do nemátode.

A evidência da menor expressão do gene codificante da GHF16 em fêmeas face a machos e JIII crescidos em planta (Figura 12) sugere um papel menos ativo destas no mecanismo em que esta enzima estiver envolvida.

7.1.2.1.2. Pectato liase

O grupo de pectato liases também representa uma importante ação na degradação da parede celular de plantas, nomeadamente na degradação de componentes da parede celular em plantas como a pectina^{88,111}. A sequência BxPt17_MFJ_004650 foi anotada como uma PEL segundo o pipeline de análise e como uma CAZyme PEL da família 3 através da ferramenta CAT (Tabela 18). Kikuchi e colaboradores¹¹¹ estudaram uma PEL em *B. xylophilus*, cuja sequência apresenta grande similaridade com a sequência BxPt17_MFJ_004650 (Tabela 18). Interessantemente, os autores reportaram a grande similaridade da sequência identificada como PEL com enzimas PEL da família 3 pertencentes a bactérias, fungos e nemátodes¹¹¹. Este resultado valida a confiança na estratégia de anotação de CAZymes pelo CAT. A evidência da secreção da proteína no NMP¹¹¹ está de acordo com o resultado obtido pela previsão da presença de peptídeo sinal e ausência de TM na sequência BxPt17_MFJ_004650 (Tabela 18).

A sobre-expressão da proteína em nemátodes crescidos em planta face a nemátodes crescidos em fungo apresentada nos resultados RT-qPCR (Figura 12), indica o potencial envolvimento da proteína na degradação de componentes das paredes celulares^{88,111} e, conseqüentemente, no mecanismo de patogenicidade do NMP.

7.1.2.2. Proteínas alergénicas

Os transcritomas dos nemátodes *B. xylophilus* em estudo apresentaram a expressão de duas VAPs, codificadas pelas sequências BxPt17_MFJ_005450 e BxPt17_MFJ_007345 (Tabela 18), as quais apresentam grande similaridade com as sequências dos genes VAP1 e VAP2 identificados em *B. xylophilus* por Lin e colaboradores⁹², respetivamente (Tabela 18). Tanto a VAP1 como a VAP2 apresentaram uma acumulação nas glândulas esofágicas do nemátode^{92,93}, indicativo de serem secretadas para o interior da árvore. As sequências BxPt17_MFJ_005450 e BxPt17_MFJ_007345 apresentaram a presença putativa de um peptídeo sinal e ausência de TM (Tabela 18), revelador da potencialidade das respetivas proteínas serem, também elas, secretadas. Estas proteínas podem desenvolver importantes interações moleculares com a planta, concretamente a nível da supressão da reação de defesa do hospedeiro⁹³, não se conhecendo totalmente a sua ação no mecanismo de parasitismo do NMP.

Os resultados da expressão diferencial apresentados na Figura 12 indicam a sub-expressão de ambos os genes nos nemátodes crescidos em planta fase aos crescidos em fungo, à exceção da sobre-expressão superior a 18 vezes da VAP2 em machos. Este resultado está de acordo com a indicação do Myrna (Tabela 18), revelando a importância desta ferramenta no estudo e previsão da expressão diferencial de contigs com base no processamento das *reads*.

Os resultados obtidos por RT-qPCR não estão de acordo com a sugestão de que as VAPs têm uma ação efetiva no mecanismo de parasitismo do NMP como supressão da reação de defesa da planta⁹³. Kang e colaboradores⁹³ demonstraram que as VAPs estão mais ativas em nemátodes propagativos crescidos em planta que as mesmas formas de vida crescidas em fungo. Os autores avaliaram o nível de expressão das VAPs ao fim de um mês de infeção, sugerindo a ativação das VAPs em planta como mecanismo de supressão da reação de defesa desta. A integração dos nossos resultados, obtidos ao fim de três semanas de inóculo, levanta a questão da necessidade do nemátode em suprimir a reação de defesa do hospedeiro numa fase de desenvolvimento

da doença já avançada. A mudança da fase inicial para a fase avançada de desenvolvimento da DMP é caracterizada pela diminuição da intensidade da reação de defesa da planta⁵³, sugerindo que com o avanço do desenvolvimento da doença, a necessidade de supressão da reação de defesa da árvore seja cada vez menor. Considerando que as VAPs possam estar efetivamente associadas à supressão da reação de defesa do hospedeiro do NMP, as diferenças de expressão destas ao longo do desenvolvimento da doença poderão elucidar sobre o padrão de interação molecular do nemátode com a planta e inclusive definir com mais detalhe a evolução da doença.

Kang e colaboradores demonstraram que a VAP1 contribui para a maior capacidade de migração dos nemátodes⁹³. Assumindo a similaridade estrutural das sequências VAPs em *B. xylophilus* e o facto de pertencerem à mesma família de proteínas, é provável que desempenhem funções semelhantes. Assim, a indicação que o macho sobre-expressa a VAP 2, levanta a sugestão de esta poder também contribuir para uma maior taxa de migração do nemátode.

7.1.2.3. Calreticulina

A sequência BxPt17_MFJ_002078 foi anotada como codificante da proteína calreticulina (CAL) (Tabela 18). A similaridade com a sequência da CAL estudada por Li e colaboradores⁹⁵ demonstra tratar-se do mesmo gene (Tabela 18). À semelhança da sequência identificada por este grupo, também a sequência BxPt17_MFJ_002078 apresenta um peptídeo sinal putativo (Tabela 18), indicativo de que poderá ser potencialmente secretada pelo nemátode.

A CAL é uma proteína que liga cálcio e é uma proteína do retículo endoplasmático (RE), onde atua como um chaperona. Para além do ER, a CAL tem sido encontrada no envelope nuclear, no citoplasma e na superfície da célula, estando envolvida na exportação de proteínas para o exterior da célula¹⁷⁴, na degradação de mRNA¹⁷⁵, ou na adesão celular¹⁷⁶. A calreticulina regula a homeostase do cálcio e intervém na regulação de vias metabólicas, no ciclo celular, no crescimento celular e diferenciação, na endocitose, exocitose e secreção¹⁷⁷. A calreticulina está presente nas secreções de vários nemátodes parasitas de vertebrados como *Necator americanus* e *H. contortus*, no platelminta *Schistosoma mansoni* e em *Amblyomma americanum*, e foi ainda descrita nas secreções de *M. incognita*⁹⁴ mas a sua função no parasitismo não está ainda esclarecida. A ativação da proteína CAL em nemátodes parasitas de planta como

*M. incognita*⁹⁴ sugere a existência de uma ação transversal entre os mecanismos de parasitismo deste nemátode e *B. xylophilus*, podendo estar associada a um processo biológico essencial ao nemátode face à sobrevivência no hospedeiro⁴².

Os níveis de expressão determinados por RT-qPCR (Figura 12) demonstram a sobre-expressão do gene em machos e nemátodes JIII. Este resultado está de acordo com a previsão do Myrna (Tabela 18), evidenciando diferentes níveis de expressão entre os nemátodes crescidos em planta. Li e colaboradores⁹⁵ demonstraram que a CAL está mais ativa em adultos do que nas restantes fases de vida propagativa do nemátode crescido em fungo. Os resultados apresentados na Figura 12 apresentam uma expressão similar da sequência BxPt17_MFJ_002078 entre machos e juvenis JIII, sugerindo a maior ativação deste gene em JIII crescido em planta que as formas propagativas do nemátode crescido em fungo. Este resultado revela a potencialidade de existirem processos biológicos ativos diferencialmente entre os estágios juvenis propagativo e dispersivo do NMP em planta. Desta forma, a CAL poderá representar uma função importante no nemátode durante o parasitismo e sendo expressa em JIII, poderá elucidar acerca das interações moleculares que os nemátodes estabelecem com a planta hospedeira.

O leque de funções a que a CAL está potencialmente envolvida em nemátodes parasitas de plantas⁹⁴ sugere que esta possa exercer funções diferentes em estágios de vida diferentes do nemátode. Assim, a ativação do gene em machos e nemátodes JIII poderá dever-se a interações moleculares diferentes, sendo, no entanto, ambas importantes para o parasitismo pelo facto de pertencerem ao secretoma do nemátode durante a infeção⁹⁵ e apresentarem uma sobre-expressão durante a infeção de planta em comparação ao crescimento em fungo (Figura 12).

7.2 Metabolismo do homogentisato

A abordagem de transcritômica comparativa integrada com Myrna permitiu a identificação do metabolismo do homogentisato (Tabela 14) como um processo biológico diferencialmente ativo em *B. xylophilus*, comparativamente ao organismo filogeneticamente próximo *B. mucronatus*. Esta indicação poderá revelar importantes informações na medida em que existem evidências que o homogentisato diminui a produção de ROS interacelularmente, inibe a apoptose celular induzida por H₂O₂ e

aumenta atividades enzimáticas de enzimas antioxidantes como a catalase^{138,139}. A potencial importância do metabolismo do homogentisato motivou o estudo mais detalhado da expressão dos genes envolvidos na sua via metabólica.

A ausência de anotação de enzimas envolvidas neste processo biológico em *B. mucronatus* não permitiu a avaliação do nível de expressão entre os dois organismos crescidos nas mesmas condições, em fungo. No entanto, a comparação de maior interesse foca-se em *B. xylophilus*, permitindo o estudo da ativação desta via entre os nemátodes crescidos em fungo e na árvore. A biblioteca conjunta referente aos transcritomas dos estágios do nemátode crescido em planta foi utilizada para identificar homólogos das proteínas envolvidas no metabolismo do homogentisato. A biblioteca conjunta de *B. xylophilus* crescido em planta foi submetida a anotação com recurso à ferramenta KAAS. As 4 enzimas foram anotadas na biblioteca conjunta representando a primeira indicação da ativação desta via no nemátode durante o parasitismo (Tabela 18). O Myrna não identificou estas sequências como diferencialmente expressas entre as amostras de *B. xylophilus* crescidos em planta (Tabela 18).

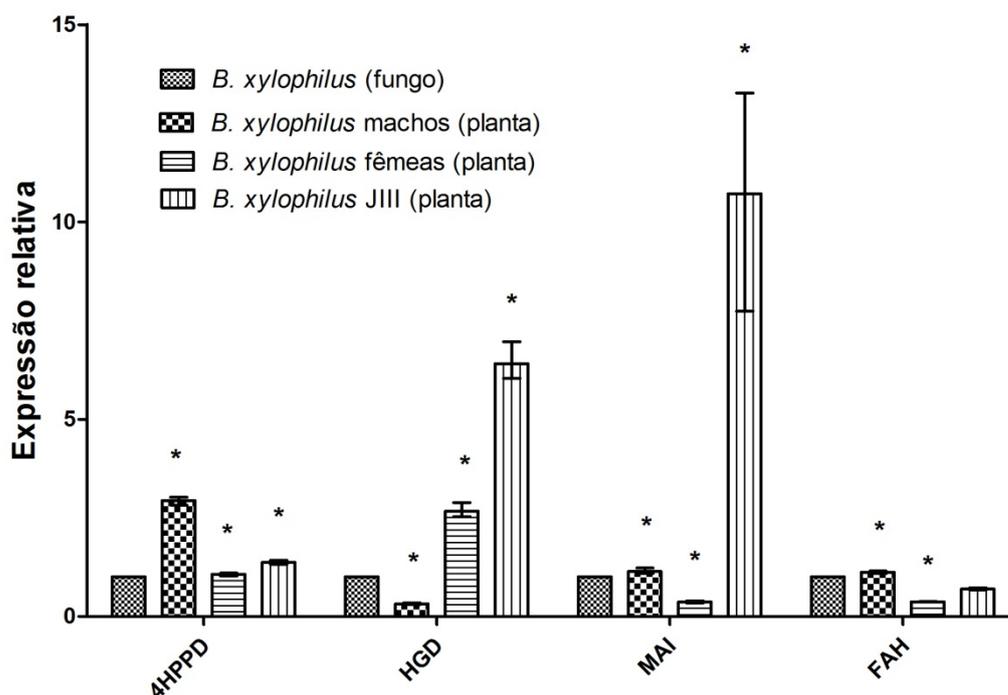


Figura 13 - Resultados de RT-qPCR de genes envolvidos na via metabólica do homogentisato. A expressão das enzimas 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (4HPPD), homogentisato 1,2-dioxigenase (HGD), maleilacetoacetato isomerase (MAI) e fumarilacetoacetato (FAH) é mostrada relativamente à amostra calibradora, *B. xylophilus* crescido em fungo. Os dados estão apresentados na forma de média±limites, com n=3 a nível de poço em cada placa submetida a real time PCR. * significa uma expressão diferencial com *p-value* < 0,05, determinada pelo REST Para cada gene a expressão foi determinada contra o calibrador interno proteína 42 de controlo da divisão celular.

Os resultados de RT-qPCR, apresentados na Figura 13, são extremamente interessantes tendo em conta a possível ação do homogentisato no mecanismo de destoxificação de stress oxidativo. Os nemátodes machos apresentaram uma sobre-expressão da 4HPPD (EC: 1.13.11.27) e sub-expressão da HGD (EC: 1.13.11.5) face a *B. xylophilus* crescido em fungo, níveis de expressão compatíveis com a acumulação de homogentisato intracelularmente (Figura 13). Em adição, a sobre-expressão da enzima MAI (EC: 5.2.1.2) e FAH (EC: 3,7,1,2) são pouco acentuadas, sendo estes resultados concordantes com a acumulação de homogentisato (Figura 13). A conjugação destes resultados sugere que este metabolito poderá exercer uma importante ação no metabolismo dos machos durante o parasitismo, potencialmente na destoxificação oxidativa do nemátode na árvore hospedeira. O metabolismo da tirosina em *C. elegans* é conservado face ao mesmo processo em outros eucariotas¹⁷⁸, resultado concordante com as anotações obtidas pelos termos KEGG (Figura 13). No entanto o padrão de expressão dos genes analisados obtido nos nemátodes machos é único face às restantes forma de vida analisadas em planta. Esta evidência sugere que o homogentisato possua diferentes funções entre os nemátodes. É interessante o facto de que a única enzima de destoxificação que os NMP machos apresentaram sobre-expressa foi a catalase. Kang e colaboradores demonstraram que a acumulação de homogentisato promove o aumento da atividade enzimática da catalase e a sua expressão celular¹³⁸. Os autores sugeriram que esta ação pode estar relacionada com a potencial ação do homogentisato na inibição da produção de ROS, diminuindo o seu nível intracelular, o que promove o aumento da função de enzimas antioxidantes. O aumento da expressão da catalase foi sugerido como uma consequência da ativação da cinase regulada por sinais extracelulares (ERK), a qual está a montante do fator nuclear kappa B (NF-κB). A potencial ativação da via do NF-κB, associada ao facto do fator de transcrição potenciar a expressão de enzimas antioxidantes como a catalase¹⁷⁹, suportou a evidência do aumento de nível da catalase intracelularmente. A acumulação do homogentisato pode representar, assim, um mecanismo específico de destoxificação das ROS intracelulares produzidas durante a defesa aos estímulos do pinheiro.

Os nemátodes JIII apresentaram uma interessante sobre-expressão das enzimas HGD e MAI, em adição à sobre-expressão da 4HPPD, resultados os quais estão de acordo com a indicação que as enzimas em estudo não atuam somente no metabolismo do homogentisato. A potencialidade da degradação de aminoácidos aromáticos como a tirosina para produção de energia celular¹⁷⁸, poderá explicar o padrão de expressão em

nemátodes JIII. Como estes não se alimentam, a obtenção de energia necessária para a sobrevivência em condições adversas poderá consistir em mecanismos alternativos como este. No entanto, o elevado nível de expressão destas enzimas sugere que estas possam exercer funções importantes em outros processos biológicos.

As fêmeas apresentaram uma grande sobre-expressão da HGD e uma sub-expressão da MAI e FAH face a *B. xylophilus* crescido em fungo. Estes resultados revelam a grande ativação da HGD. As evidências da sobre-expressão desta enzima em nemátodes fêmeas e JIII sugerem que esta proteína possua uma função importante nestes nemátodes durante a indução do parasitismo no parasitismo.

7.3 Peptidases

Os níveis de expressão das peptidases quantificados estão apresentados na Figura 14.

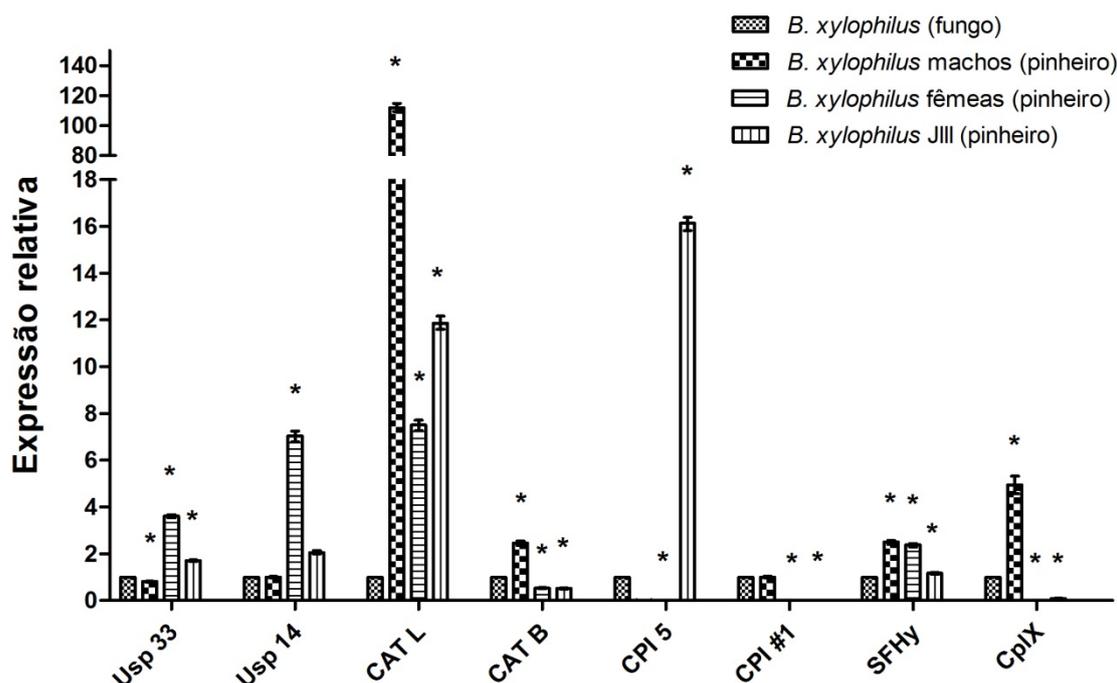


Figura 14 - Resultados de RT-qPCR das peptidases de interesse identificadas. A expressão das enzimas C-terminal ubiquitina hidrolases 33 e 14 (USP33 e USP14, respetivamente), catepsinas L e B (CATL e CATB, respetivamente), inibidoras de protease cisteínica #1 e 5 (CPI #1 e CPI 5, respetivamente), S-formilglutaciona hidrolase (SFHy) e epóxido hidrolase 1 (EPOX) é mostrada relativamente à amostra calibradora, *B. xylophilus* crescido em fungo. Os dados estão apresentados na forma de média±limites, com n=3 a nível de poço em cada placa submetida a real time PCR. * significa uma expressão diferencial com $p\text{-value} < 0,05$, determinada pelo REST Para cada gene a expressão foi determinada contra o calibrador interno proteína 42 de controlo da divisão celular.

7.3.1 C-terminal hidrolases de ubiquitina

As peptidases C-terminal hidrolases de ubiquitina 14 e 33 (Usp14 e Usp33 respetivamente) são proteínas deubiquitinases envolvidas no processo de ubiquitinação-proteossoma. A ubiquitinação, de forma geral, é o processo pelo qual a molécula de ubiquitina se liga a proteínas para que estas sejam reconhecidas pelo proteossoma e, conseqüentemente, degradadas. É a principal via de degradação de proteínas intracelulares sem intervenção de lisossomas e desempenha uma ação importante em diversas respostas das células incluindo divisão celular, proliferação, apoptose e resposta a condições de stress¹⁸⁰. A ubiquitinação é, assim, considerado um processo biológico determinante para o metabolismo e homeostase normais de um organismo. As proteínas intervenientes no processo de proteólise mediado pelo proteossoma são alvos interessantes de estudo para perceber a ativação destes processos biológicos nos nemátodes e elucidar os tipos de resposta molecular que ocorrem durante a infeção da planta hospedeira.

A Usp14 é um componente da subunidade reguladora 19S do proteossoma que regula a entrada de proteínas ubiquitinadas no centro deste¹⁸⁰. Peth e colaboradores demonstraram que a Usp14 é necessária para o estímulo de abertura da porta do proteossoma 20S, evento regulador da sua capacidade proteolítica. O estímulo ocorre quando a porta está fechada ou transientemente aberta e a associação da Usp14 promove a eficiente hidrólise das proteínas ubiquitinadas¹⁸¹. Desta forma, é sugerido que esta proteína promove a ação degradadora do proteossoma¹⁸⁰. No entanto, o papel da Usp14 ainda não está totalmente esclarecido e as evidências são por vezes contraditórias. Existem evidências que apontam o seu envolvimento na redução de eventos proteolíticos¹⁸². É sugerido que a USP14, como enzima de deubiquitinação, é importante na regulação do equilíbrio de ubiquitina nas células, promovendo a hidrólise da ubiquitina em substratos proteicos do proteossoma¹⁸³. Para além da relação direta com o proteossoma, existem evidências que a USP14 está envolvida na regulação de respostas biológicas como a função neuronal¹⁸⁴ e a sinalização de citocinas¹⁸⁵. Crimming e colaboradores demonstraram que uma estirpe mutada de rato com perda da função da USP14 exibiu uma reduzida taxa de crescimento e ataxia¹⁸⁶.

A Usp33 é uma deubiquitinase que estabelece interações associadas a diversos eventos fisiológicos como proteínas supressoras de tumores, a E3 ubiquitina-ligase no controlo da resposta celular a condições de hipoxia, no desenvolvimento cerebral e na

deubiquitinação de β -arrestinas¹⁸⁷. No entanto, a função particular de deubiquitinação de β -arrestinas é considerada uma das ações com maior importância na resposta celular a estímulos externos, ou seja, que poderá representar maior interesse de estudo sob a perspectiva de investigar as diferentes reações metabólicas face à exposição de estímulos externos por parte das amostras em estudo. De modo geral, as β -arrestinas medeiam a renovação/tráfego intracelular dos receptores β -adrenérgicos (β -ARs), processo através do qual a quantidade de β -ARs na membrana celular é aumentada e a célula exerce uma resposta a estímulos externos. A exposição continuada aos β -ARs promove o desencadeamento de um mecanismo de controlo celular interno, onde estes recetores são ubiquitinados de forma a serem degradados¹⁸⁸. A ubiquitinação das β -arrestinas desencadeia o mecanismo pelo qual a ubiquitinação dos β -ARs é promovida e, consequentemente, a redução da resposta celular¹⁸⁹. Desta forma, a ação enzimática de deubiquitinação das β -arrestinas pelo Usp33 é de grande importância para promover o tráfego intracelular contante de β -ARs e, consequentemente, a continuação da intensidade da resposta celular aos estímulos externos¹⁸⁸. Em mamíferos, os β -ARs medeiam a resposta celular a catecolaminas como dopamina, adrenalina e noradrenalina¹⁹⁰. A dopamina em nemátodes é um importante neurotransmissor que desempenha um papel primário no reconhecimento e resposta a sensações mecânicas como o toque¹⁹¹.

Os resultados de RT-qPCR, apresentados na Figura 14, mostram que os nemátodes crescidos em planta apresentam diferentes níveis de ativação das Usp estudadas em comparação com os nemátodes crescidos em fungo. A Usp33 é sobre-expressa em fêmeas e em JIII crescidos em pinheiro, enquanto a Usp14 apenas é expressa diferencialmente pelas fêmeas. Os níveis de expressão diferencial entre as formas de vida de *B. xylophilus* crescidas em planta estão de acordo com as indicações do Myrna (Tabela 18).

O facto de a fêmea sobre-expressar a USP14 face aos nemátodes crescidos em fungo e às outras populações de nemátodes em estudo crescidos em planta poderá estar relacionado com a maior importância para a fêmea na manutenção da eficiência do proteossoma, já que para além de garantir sobrevivência também é o estágio envolvido na reprodução. Assim, as fêmeas poderão possuir uma maior necessidade de regulação da eficiência do proteossoma em comparação com os restantes nemátodes da população durante a infeção de árvores hospedeiras. Por outro lado, existem evidências de elevados níveis de mRNAs da USP14 em condições fisiológicas de perda de capacidade

motora¹⁹². Chen e colaboradores¹⁸⁴ demonstraram que a USP14 é indispensável na regulação do desenvolvimento sináptico e da função das junções neuromusculares. Ratos deficientes na produção da proteína apresentaram perda de massa muscular e alterações estruturais nas junções neuromusculares, potencialmente, por diminuição da capacidade proteolítica nas sinapses. O restabelecimento da produção da proteína promoveu o equilíbrio dos níveis de ubiquitina no circuito de neurónios motores e a capacidade motora dos ratos¹⁸⁴. Assim, os resultados da USP14 apresentados na Figura 14 poderão indicar que os nemátodes fêmeas poderão sofrer uma maior redução na sua capacidade motora, face às outras formas de vida do nemátode, como consequência do ataque da planta, e apresentarem maior dificuldade de migração ao longo da árvore, ativando a expressão da USP14. Esta migração diferencial poderá levar a uma distribuição dos nemátodes na árvore não uniforme e, em última instância, as condições de stress experienciadas ao longo da migração pelo hospedeiro também não uniformes. O facto da capacidade motora dos nemátodes ser um aspeto determinante na sua habilidade de induzir uma efetiva infeção do hospedeiro⁴⁷ sugere que a utilização de compostos químicos que atuam sobre o sistema nervoso do nemátode, mais precisamente nos circuitos neuronais que controlam a função muscular e a mobilidade, possam ser, também para este nemátode, uma forma de controlo eficaz¹⁹³. Diferentemente, a hipótese da sobre-expressão da USP14 estar associada a algum mecanismo relacionado com a reprodução ou o metabolismo exclusivo das fêmeas também é válida.

Uma vez que a Usp33 pode elucidar acerca da intensidade da resposta celular a estímulos externos, é esperado que a enzima seja sobre-expressa nos nemátodes crescidos em planta face aos crescidos em condições ótimas. Os resultados da Figura 14 apenas mostram a sobre-expressão da USP33 em nemátodes fêmeas e JIII. A sobre-expressão da Usp33 em fêmea face a JIII e machos, e em JIII face a machos, indica a nível comparativo, que os machos poderão estar sujeitos a um menor número de estímulos externos associados aos β -ARs ou a diferentes intensidades. Numa outra perspetiva, este resultado está de acordo com o estudo sobre a expressão de recetores de neurotransmissores como a dopamina em *H. contortus* desenvolvida pelo grupo de Rao¹⁹⁴. Os resultados indicaram diferenças de expressão do recetor em estudo entre as diversas fases de vida do nemátode onde as fêmeas apresentaram maior expressão, seguidas pelas etapas larvais e por último, com menor expressão, os machos¹⁹⁴. Uma evidência que poderá justificar estas diferenças de expressão consiste na presença de um

maior número de neurónios mecano-recetores em machos à imagem do que acontece com *C. elegans*¹⁹⁵. Este facto leva à sugestão de uma menor necessidade dos machos em expressar recetores individuais, potencialmente existindo uma ação conjunta entre toda a bateria de recursos para o reconhecimento e resposta a estímulos externos mecânicos. Adicionalmente à sugestão que nem todos estes neurónios adicionais em macho estão relacionados com o acasalamento¹⁹⁵, o facto de existirem recetores de neurotransmissores exclusivos de nemátodes e cuja função ainda está por esclarecer¹⁹⁶, suporta a hipótese que possam existir diferenças de expressão de recetores como os β -ARs entre nemátodes apesar de experienciarem os mesmo estímulos externos.

Os resultados indicam a importância desta enzima nos nemátodes crescidos em planta e, conseqüentemente, a importância dos β -ARs no reconhecimento de neurotransmissores e promoção de uma resposta contínua de forma a garantir a sobrevivência. Assim, o sistema neuronal do nemátode está ativo e é determinante no reconhecimento dos estímulos externos. Logo, o mecanismo de controlo visando os β -ARs poderá ser uma via de controlo, como já é investigada para nemátodes parasitas de animais¹⁹⁴.

As evidências da presença de catecolaminas em plantas¹⁹⁷ constituem uma descoberta intrigante porque as funções de neurotransmissores não encaixam na biologia vegetal tal como é conhecida. É sugerido que as catecolaminas em plantas poderão estar envolvidas em processos regulatórios desta, assim como na interação com agentes patogénicos¹⁹⁸. Reo e colaboradores demonstraram que a exposição a dopamina externa promove paralisia muscular no nemátode parasita de animais *H. contortus*¹⁹⁶. A sobre-expressão da USP33 em fêmeas e JIII poderá, assim, representar a resposta fisiológica a uma potencial ação inibitória da dopamina produzida pela planta à capacidade motora dos nemátodes. A produção de dopamina como uma reação de defesa ao ataque de agentes patogénicos constitui, assim, uma potencial função para esta molécula, tendo em conta a grande incerteza funcional acerca das catecolaminas produzidas por plantas. A USP33 poderá representar um interessante alvo de estudo na medida em que representa quer um mecanismo de regulação do nemátode a estímulos externos físicos, quer por permitir estudar outras formas dos nemátodes machos identificarem esses estímulos externos e como as diferenças de identificação face a fêmeas e JIII poderão contribuir para o mecanismo de patogenicidade do NMP.

7.3.2 Catepsinas

Um dos grupos de peptidases com maior interesse em nemátodes parasitas de plantas, é o das proteases de cisteína, onde as catepsinas (CATs) ocupam um lugar de destaque⁸⁸. As catepsinas representam o maior componente do sistema proteolítico lisossomal¹⁹⁹. Assim estas proteases são consideradas principais intervenientes em interações hospedeiro-parasita como a colonização do hospedeiro, quebra de tecidos durante a propagação, invasão do sistema imunitário e digestão de nutrientes essenciais para a sobrevivência do parasita²⁰⁰. Desta forma, os processos biológicos aos quais estão associadas revelam o interesse no estudo da importância destas proteínas em parasitas de animais, sobre a forma como podem assumir uma ação efetiva no mecanismo de patogenicidade e, conseqüentemente, constituir um alvo válido para o controlo do organismo patogénico. A estratégia integrada da anotação pelo Merops e a indicação dos níveis de expressão *in silico* pelo Myrna identificaram 2 catepsinas diferencialmente expressas (Tabela 18).

A catepsina representada pela sequência BxPt17_MFJ_002870 (Tabela 18) consiste numa catepsina L, apesar de ser anotada no Merops e BLASTP no pipeline de processamento das *reads* como correspondente a uma catepsina F. A submissão da sequência BxPt17_MFJ_002870 contra a base de dados curada Swiss-Prot obteve como melhor correspondência uma catepsina L e como segunda melhor correspondência uma catepsina F, com um E-value de $3e^{-97}$ e $7e^{-88}$, respetivamente. A maior confiança na abordagem utilizando uma base de dados curada e a evidência que a anotação da sequência no Merops obteve um E-value de $4,9e^{-62}$, resultou na consideração da enzima catepsina L.

As catepsinas L têm sido identificadas em muitas espécies de nemátodes parasitas de animais como *Dictyocaulus viviparus* e *H. contortus*²⁰¹ e, também, em nemátodes parasitas de plantas como *M. incognita*²⁰² e *H. glycines*²⁰³. Em nemátodes parasitas, a principal ação da catepsina L está relacionada com a digestão extracelular de proteínas importantes para a nutrição do nemátode, como é o caso do *H. contortus*²⁰². No entanto Britton e colaboradores, baseando-se em alinhamentos de sequências, demonstraram a distribuição das catepsinas L de nemátodes parasitas de animais e de parasitas de plantas em diferentes *clusters*²⁰¹. Este resultado está de acordo com a sugestão de que as enzimas podem apresentar especificidade para diferentes substratos,

o que não é estranho já que os nemátodes têm de se adaptar às condições onde vivem e estas são diferentes entre os nemátodes parasitas de plantas e animais.

A catepsina L identificada neste trabalho apresenta grande similaridade a nível da sequência de aminoácido com a catepsina L de *M. incognita*²⁰² com ID CAD89795 no GenBank, cujo E-value do alinhamento é de $1e^{-60}$. Adicionalmente, ambas partilham um potencial peptídico sinal²⁰² (Tabela 18), revelando o grande interesse no estudo desta proteína devido à potencialidade de estar envolvida no mecanismo de patogenicidade dos nemátodes. A função da catepsina L em nemátodes parasitas de plantas ainda não está totalmente esclarecida. Neveu e colaboradores²⁰² demonstraram a evidência de uma grande abundância de transcritos de catepsina L expressos em juvenis parasitas de *M. incognita* que ainda não alcançaram as células vegetais por onde se alimentam dentro da planta (características deste grupo de nemátodes). Esta evidência em adição à presença de um peptídico sinal na sequência codificante suportaram as conclusões dos autores consistindo na hipótese de que ao contrário do que inicialmente se pensava sobre a função da catepsina L estar relacionada com a digestão de proteínas no intestino do nemátode como meio de nutrição, a função poderia estar diretamente associada às interações nemátode-planta e, conseqüente, patogenicidade²⁰². A importância potencial destas enzimas no mecanismo de patogenicidade dos nemátodes tem sido utilizada como um fator determinante na denominação das catepsinas como alvos favoráveis em estratégias de controlo. A utilização de cistatinas, inibidores da atividade enzimática de catepsinas, nomeadamente catepsinas L, em sementes transgênicas tem sido uma estratégia proposta com grande expectativa (revisito em¹⁹⁹). Desta forma, a importância potencial da catepsina L em nemátodes parasitas de plantas poderá identificá-la como um interessante alvo para estratégias de controlo do NMP.

A catepsina B foi a outra protease cisteínica identificada como potencialmente interessante para o estudo das diferenças de expressão entre as amostras em estudo. Os resultados do Myrna indicaram uma potencial expressão diferencial desta enzima (Figura 14). O grande foco de estudo desta enzima centra-se em nemátodes parasitas de animais, pois esta, à semelhança da catepsina L, exerce uma importante ação de degradação de proteínas do hospedeiro, como a hemoglobina, com um fim nutritivo²⁰⁴. Skuce e colaboradores demonstraram que a catepsina B é expressa em *H. contortus* apenas nos estágios parasíticos de alimentação baseada no sangue do hospedeiro²⁰⁵. A grande abundância desta enzima nas secreções de *H. contortus*²⁰⁶, constituiu esta como um dos alvos mais promissores no controlo deste nemátode patogénico. Newton e

colaboradores apresentaram exemplos de catepsinas B que quando usadas como vacinas, diminuem o grau de patogenicidade dos nemátodes em infecções posteriores²⁰⁷.

As catepsinas B em *H. contortus* contêm um peptídeo sinal indicando a potencialidade de serem secretadas²⁰⁶. O estudo da potencial presença de peptídeo sinal na sequência BxPt17_MFJ_003305, codificante da catepsina B de NMP em estudo, indicou que esta não apresenta um peptídeo sinal (Tabela 18). A evidência de que a catepsina B não é secretada pelo nemátode e a diferença do padrão de expressão gênica entre as amostras em estudo comparativamente aos resultados da catepsina L, sugere que estas duas proteínas exerçam funções distintas e potencialmente em processos biológicos divergentes. A expressão da catepsina B apenas foi significativamente maior em machos crescidos em planta face às populações crescidas em fungo (Figura 14). Estes resultados sugerem que a proteína não possua uma ação envolvida em interações moleculares do nemátode face à planta, mas potencialmente está associada a função degradativa nos lisossomas ou associada exclusivamente a machos.

Os resultados de RT-qPCR apresentados na Figura 14 indicam uma sobre-expressão da catepsina L nos nemátodes crescidos em planta face aos crescidos em fungo. Este resultado é muito interessante pois demonstra a necessidade de expressar esta proteína em grande quantidade aquando da infeção da planta. O facto de a expressão ser muito menor em nemátodes crescidos em fungo sugere um potencial envolvimento da catepsina L no mecanismo de patogenicidade do nemátode. Este potencial envolvimento abre portas para a utilização desta proteína como um alvo de controlo do nemátode em que o know-how já existente acerca da utilização destas enzimas visando o controlo de outras pestes poderá representar uma mais-valia para uma rápida e eficaz intervenção.

A evidência da expressão da catepsina L por nemátodes JIII sugere que esta proteína não esteja somente envolvida em eventos de nutrição, pois estes nemátodes não se alimentam. Assim, os nossos resultados estão de acordo com os obtidos por Neveu e colaboradores²⁰² na medida em que a catepsina L também foi expressa por nemátodes juvenis que ainda não tinham iniciado o processo de alimentação. No entanto, os resultados do estudo deste autor também indicaram a inexistência de expressão da enzima em machos. O facto dos mecanismos de patogenicidade serem tão diferentes poderá justificar as diferenças de expressão da catepsina L entre os dois nemátodes. *M. incognita* como endoparasita sedentário caracteriza-se pela ação das fêmeas e juvenis como principais intervenientes no parasitismo²⁰², já o mecanismo de patogenicidade de

B. xylophilus é caracterizado, até agora, por uma indiferença na capacidade de parasitismo entre as diferentes etapas de vida do nemátode. Assim, considerando as origens independentes no parasitismo entre nemátodes²¹ sugere-se que os machos de *B. xylophilus* também expressem a catepsina L com a mesma função exercida pela enzima em outros nemátodes parasitas de plantas.

Os resultados apresentados na Figura 14 mostraram que em nemátodes crescidos em planta face a nemátodes crescidos em fungo, há uma sobre-expressão da catepsina B em machos e uma sub-expressão em fêmeas e JIII. O facto da catepsina B, à imagem da catepsina L, ser expressa em JIII sugere que esta desempenha uma ação diferenciadora face às funções de homólogos em nemátodes parasitas de animais. A sobre-expressão da catepsina B em machos sugere o possível envolvimento desta com um processo exclusivo de machos, no sentido de que a expressão desta enzima poderá garantir o normal funcionamento de processos biológicos associados à reprodução. A importância desta enzima em machos e o facto de ser utilizada eficientemente como alvo de controlo de nemátodes, poderá indicar em estudos futuros a catepsina B como um interessante alvo de controlo dos machos e, conseqüentemente, influenciar toda a população de nemátodes no hospedeiro.

7.3.3 Cistatinas

Tal como as catepsinas são importantes intervenientes em muito processos determinantes para a patogenicidade, também os inibidores de catepsinas (CPI) e de outras proteases cisteínicas, as cistatinas, possuem funções relevantes no parasitismo. Em nemátodes parasitas de animais, como o caso de *B. malayi*, as cistatinas inibem proteínas envolvidas no reconhecimento de antígenos pelo sistema imunitário do hospedeiro¹⁴² ou proteases constituintes da reação de ataque do hospedeiro⁸⁷. Neste estudo foram identificadas duas cistatinas, #1 e 5, como diferencialmente expressas nos nemátodes crescidos em pinheiro (Tabela 18). À semelhança da maioria das cistatinas¹⁴², as cistatinas #1 e 5 também apresentam um peptídio sinal (Tabela 18), indicando a potencialidade de serem secretadas para o meio extracelular.

A função das cistatinas em nemátodes parasitas de plantas foi até agora pouco explorada. Bellafiore e colaboradores identificaram cistatinas em secreções das glândulas esofágicas do nemátode parasita de plantas *M. incognita*¹⁴³. A cistatina reportada foi a cistatina 2¹⁴³, tal como a cistatina identificada em *B. malayi*, cuja função

consiste na inibição de proteases do hospedeiro que visam o reconhecimento de antígenos¹⁴². Estes autores, sugeriram que a conservação entre as sequências de *M. incognita* e *B. malayi* indica a possibilidade dos nemátodes parasitas de plantas e animais partilharem mecanismos de infecção. Assim, também em nemátodes parasitas de plantas, o envolvimento de cistatinas na fuga ao sistema de reconhecimento de parasitas pela planta é uma hipótese. Não existem dúvidas quanto ao papel de proteases em plantas, que para além das funções basais de remoção de proteínas não funcionais e libertação de aminoácidos para reciclagem de proteínas, também possuem uma ação determinante no processo de reconhecimento de patógenos e indução de repostas de defesa efetivas (revisado em²⁰⁸). Desta forma, o estudo da expressão de cistatinas é importante na elucidação sobre o eventual papel de cistatinas no parasitismo de *B. xylophilus*.

Os resultados de RT-qPCR apresentados na Figura 14 indicam expressão da catepsina 5 apenas em nemátodes JIII. O BLASTP da respetiva sequência, BxPt17_MFJ_008038 (Tabela 18), contra a base de dados curada do Swiss-Prot revelou maior homologia com cistatinas de planta, nomeadamente *Arabidopsis thaliana* e *O. sativa* e apresentando um E-value de $1,00e^{-8}$ e $2,00e^{-8}$, respetivamente. Estes resultados sugerem que esta enzima poderá atuar na mimetização de moléculas produzidas pela planta.

A evidência da ativação da enzima CPI 5 em nemátodes crescidos em fungo não implica que esta enzima não possa exercer uma função de mimetização na planta. Isto porque a proteína poderá exercer a sua função a nível basal no metabolismo normal do nemátode, mas as condições experimentadas por este na planta justificarem a sua sobre-expressão em nemátodes JIII, potencialmente através de mecanismos de ativação diferentes. Uma questão interessante consiste no facto da enzima não ser expressa em adultos crescidos em planta, o que potencialmente implica que a expressão observada em fungo se deve a etapas juvenis e diferentes de JIII pois as condições de crescimento do nemátode em fungo em nenhum momento serão adversas despoletando o desenvolvimento de nemátodes J2 para JIII. Este resultado é importante na medida em que, do nosso conhecimento, existem poucas evidências de proteínas exclusivamente expressas em nemátodes juvenis em planta, representando a sobre-expressão da cistatina 5 em nemátodes JIII a primeira evidência deste mecanismo com um grande potencial de estar envolvido no parasitismo, tendo em conta o nível de sobre-expressão ser superior a 15 vezes (Figura 14).

Considerando a presença de um peptídio sinal e ausência de TM na sequência codificante da CPI 5 identificada em *B. xylophilus* e o padrão de expressão particular apresentado nas amostras em estudo, a evidência que a sequência apresenta maior homologia com proteínas de planta face a proteínas de nemátodes é desafiante. Poderá representar uma proteína exclusiva de *B. xylophilus*, o que está de acordo com a sugestão de que o parasitismo característico de *B. xylophilus* advenha de uma origem independente de outros nemátodes parasitas de plantas⁸⁵.

A sobre-expressão de CPI 5 em JIII (Figura 14) poderá estar relacionada com as proteases de reconhecimento de patogêneos e as cistatinas da planta hospedeira²⁰⁸. Esta relação revela a potencialidade da CPI 5 constituir um mecanismo importante para JIII escaparem ao reconhecimento pela planta. Esta hipótese está de acordo com as características metabólicas e anatómicas particulares de nemátodes *B. xylophilus* JIII³⁰ que não sejam partilhadas com nemátodes adultos ou até mesmo com os outros estágios larvais destes nemátodes. A evidência que antigénios de reconhecimento de nemátodes se situam na cutícula destes animais²⁰⁹ e que diferenças anatómicas entre as diferentes formas de vida de *B. xylophilus* compreendem a sua cutícula³⁰, a hipótese apresentada fica mais robusta.

A importância das diferenças entre as características anatómicas dos nemátodes torna-se mais acentuada considerando que os antigénios descritos na literatura como alvos de reconhecimento pelo hospedeiro situam-se na cutícula do nemátode²⁰⁹.

Outra hipótese de explicação dos resultados tem em conta que uma das principais necessidades de nemátodes JIII consiste em encontrar condições favoráveis para alimentação de forma a conseguir desenvolver-se para a etapa larval JIV²¹, logo a sobre-expressão exclusiva da CPI 5 em JIII poderá colocá-la como um potencial efetor associado ao suprimento da necessidade de alimento. De qualquer forma, o esclarecimento desta enzima poderia evidenciar informações importantes sobre o metabolismo de nemátodes JIII e o seu envolvimento particular na infeção do hospedeiro, assim como, a estratégia pela qual sobrevive às condições experienciadas na planta.

Os resultados de expressão diferencial da proteína CPI #1 entre as amostras em estudo, apresentados na Figura 14, demonstram a exclusiva ativação da enzima em nemátodes machos. No entanto, face aos nemátodes crescidos em fungo, os machos não apresentam sobre-expressão da CPI #1 quando crescidos em planta. Este resultado sugere que esta cistatina exerça uma função específica de machos. Numa outra

perspetiva, a CPI #1 não estará associada à degradação de proteases vegetais que visam o reconhecimento de patogêneos e, conseqüentemente, não possuindo um impacto determinante no parasitismo. Isto porque uma vez que não se encontra sobre-expressa face aos nemátodes crescidos em fungo, condições de crescimento nas quais não existem as proteases vegetais e, onde a necessidade de expressão é inexistente ou muito menor, no caso de existirem substratos para a CPI #1 em fungo. Possivelmente a CPI #1 poderá estar envolvida em processos biológicos exclusivos de machos, como por exemplo desenvolvimento do sistema reprodutor.

7.3.4 Glutathione S-formil hidrolase

A sequência BxPt17_MFJ_004108 foi anotada como uma glutathione S-formil hidrolase (*sfhy*; Figura 14). A análise com o Myrna indicou que o gene é potencialmente expresso de forma diferencial entre as amostras em estudo (Tabela 18), o que foi validado por RT-qPCR (Figura 14).

A SFHy é uma carboxiesterase ativa na hidrólise de ésteres xenobióticos vulgares e catalisa a hidrólise da glutathione S- formil em ácido fórmico e glutathione. Atua, assim, na via de destoxificação de formaldeído. Este químico é extremamente reativo, formando ligações covalentes com proteínas e ácidos nucleicos, podendo ter um efeito citotóxico²¹⁰. Em bactérias, o formaldeído é produzido nas células como produto do metabolismo de metionina, histamina, metanol e metilamina, da dissociação do derivado do ácido fólico tetrahidrofolato e di-metilação oxidativa de ácidos nucleicos²¹¹. As sequências desta enzima disponíveis em bases dados apresentam grande conservação estrutural, o que demonstra a importância da enzima no metabolismo dos organismos vivos²¹². É conservada em eucariotas e procariotas, estando bem caracterizada em organismos modelo como *Saccharomyces cerevisiae* e *A. thaliana*²¹³. Vários mecanismos de destoxificação de formaldeído evoluíram nos organismos para prevenir os efeitos letais e mutagênicos deste metabolito. O sistema de destoxificação dependente de glutathione, por exemplo, é encontrado em todos os eucariotas²¹⁴.

Existem evidências que a destoxificação de espécies reativas derivadas do carbono (ERC), como o formaldeído, constitui um importante mecanismo de sobrevivência em organismos sob condições de stress²¹⁵. A tolerância a estas moléculas reativas promove a diminuição da lesão de tecidos. Nas plantas, por exemplo, a tolerância a ERC é um dos sucessos da estratégia de melhoramento genético de espécies

comerciais²¹⁵. Desta forma, a destoxificação do formaldeído nas células do nemátode poderá aumentar a capacidade do NMP sobreviver dentro da árvore.

Os resultados de RT-qPCR, apresentados na Figura 14, mostram a sobre-expressão do gene *sfhy* nas amostras de nemátodes crescidos em planta face a nemátodes crescidos em fungo. Este resultado indica que a destoxificação do formaldeído está mais ativa no nemátode dentro da planta, o que pode contribuir para a sua sobrevivência. Estes dados sugerem que, em adição ao stress oxidativo originado por ROS endógenas produzidas como resposta às condições de stress na planta^{21,88}, também as ERC poderão constituir um fator de risco para o nemátode. Existem evidências que o formaldeído é mutagénico em *C. elegans*²¹⁶.

O nível de expressão do gene foi similar entre fêmeas e machos crescidos em pinheiro, enquanto em nemátodes JIII também isolados de plantas, o nível de expressão foi próximo do observado pelos nemátodes crescidos em fungo (Figura 14). Esta expressão diferencial pode estar relacionada com as diferentes características metabólicas entre as diferentes fases do nemátode, com especial relevo entre fases adultas e juvenis. Nemátodes JIII são especializados para sobreviver a condições de stress³⁰ e não se alimentam, pelo que o nível de atividade metabólica será mais reduzido que as formas adultas do nemátode. Estas diferenças metabólicas podem ser responsáveis pela maior ativação de enzimas de destoxificação do formaldeído em nemátodes adultos do que em JIII. Este resultado também sugere que os mecanismos de parasitismo possam ser integrados entre os nemátodes, em que toda a população potencialmente usufrui dos diferentes mecanismos de sobrevivência que cada um expressa.

7.3.5 Família de proteases caseinolíticas

Um dos genes com maior expressão diferencial segundo o Myrna corresponde ao codificado pela sequência BxPt17_MFJ_001047 (Tabela 18). O pipeline de anotação indicou tratar-se de um gene codificante da protease caseinolítica ClpX (Tabela 18). Esta protease pertence à família Clp/Hsp100 de chaperonas moleculares²¹⁷.

Em eucariotas, a homeostase da degradação intracelular de proteínas está geralmente associada ao sistema de proteossoma-ubiquitina¹⁸⁰. No entanto, este sistema não está presente em organelos eucariotas como as mitocôndrias. A degradação de proteínas nestes organelos é catalisada por proteases dependentes de ATP como a ClpX

associada à protease caseinolítica P^{218,219}. A enzima ClpX atua na matriz da mitocôndria, estando por elucidar os seus substratos em mamíferos²¹⁹.

Em *C. elegans*, a ClpX é proposta como uma proteína importante na via de sinalização que regula a resposta a proteínas sem o enrolamento correto na mitocôndria²¹⁹. É sugerido que as proteínas sem enrolamento correto ou de agregados proteicos na mitocôndria induzem uma condição de stress no organelo e que os produtos da degradação destas formas proteicas podem estar envolvidos na resposta da via de sinalização associada²²⁰. Tal como em humanos, também em *C. elegans* não existe conhecimento sobre as proteínas alvo degradadas pela ClpX²¹⁹. No entanto, Lowth e colaboradores²¹⁹ concluíram que a ClpX humana exibe formas de reconhecimento de substratos similares às conhecidas em bactérias. Atualmente, são conhecidos mais de 50 substratos proteicos da ClpX em bactérias, incluindo fatores de transcrição, enzimas envolvidas no metabolismo celular e proteínas envolvidas nas respostas ao stress oxidativo e de subnutrição²¹⁸.

A função da ClpX, de acordo com o substrato proteico associado, está envolvida em processos metabólicos importantes como a reparação do DNA, a expressão génica ou o controlo da qualidade de proteínas^{218,221}. Existe a hipótese da ClpX, tal como em bactérias, apresentar funções importantes na resposta à acumulação de proteínas sem estrutura na mitocôndria e na resposta a condições de stress extracelulares²²². A indicação da expressão diferencial do gene fornecida pelo Myrna e as potenciais funções que a proteína ClpX pode desenvolver no nemátode revela o interesse em validar os níveis de ativação do gene.

A validação dos níveis de expressão do gene *clpX* por RT-qPCR mostrou que este gene é apenas expresso em *B. xylophilus* crescidos em fungo e em machos crescidos em planta (Figura 14). O facto de o gene não estar ativo em fêmeas e juvenis crescidos em planta revela que a função desta proteína nos nemátodes poderá estar envolvida num processo exclusivo de machos. Esta exclusividade poderá estar relacionada com um substrato específico da ClpX que apenas se encontre em macho, quer por incorporação extracelular como sintetizado intracelularmente.

Kim e colaboradores demonstraram que proteínas da família ClpX são importantes na manutenção da homeostase da mitocôndria quanto à produção de proteínas funcionais em situações de toxidade em ratos machos²²³. Se a situação for reprodutível em NMP machos, este mecanismo pode ser utilizado por estes para diminuir o stress oxidativo na mitocôndria, manter a homeostase proteica na célula e

aumentar a capacidade de resistência face à resposta defensiva do pinheiro. Esta expressão diferencial sugere que a protease ClpX pode ser um alvo específico para o controlo de nemátodes machos.

7.4 Proteínas secretadas

A metodologia utilizada para detetar proteínas potencialmente secretadas pelo nemátode permitiu a identificação de 5 sequências cuja análise pelo Myrna indicou como diferencialmente expressas entre as amostras em estudo (Tabela 18). Identificamos 3 fosfatases ácido roxas e, adicionalmente foram também detetadas uma proteína residente do RE e uma proteína de ligação do retinol e ácidos gordos. A expressão individual de cada proteína foi determinada experimentalmente por RT-qPCR (Figura 15).

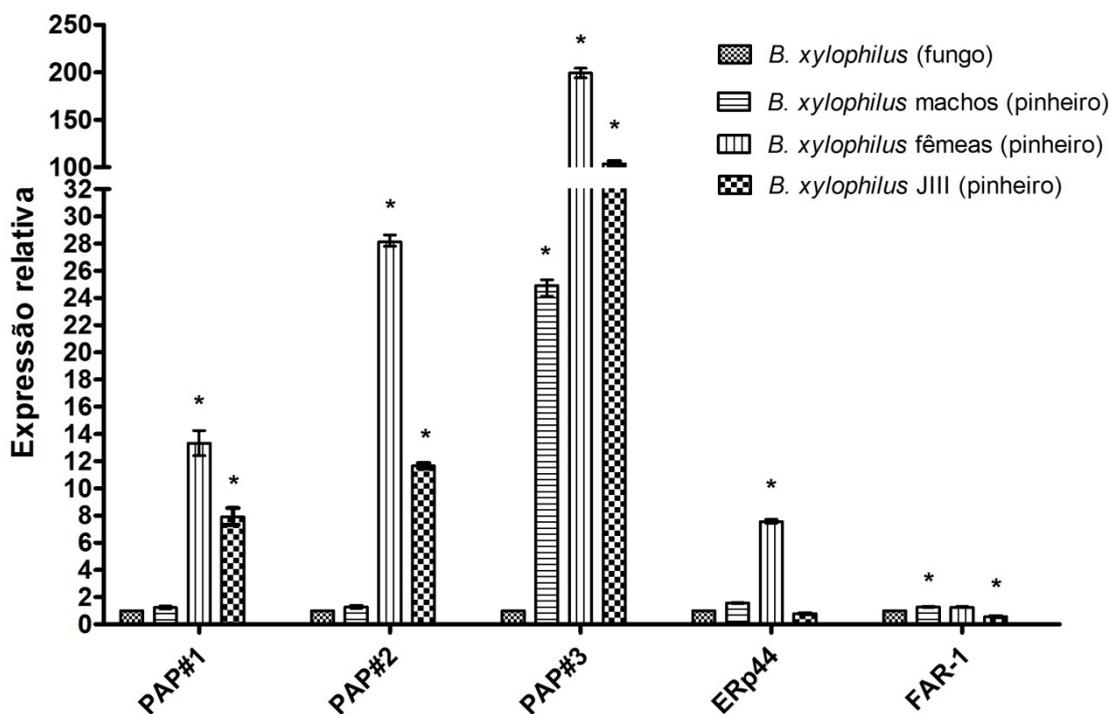


Figura 15 - Resultados de RT-qPCR de proteínas de interesse potencialmente secretadas por *B. xylophilus*. A expressão de 3 proteínas fosfatases ácidas roxas (PAP#1, PAP#2 e PAP#3), proteína 44 residente do retículo endoplasmático (ERp44) e proteína 1 de ligação ao retinol e ácidos gordos (FAR1) é mostrada relativamente à amostra calibradora, *B. xylophilus* crescido em fungo. Os dados estão apresentados na forma de média±limites, com n=3 a nível de poço em cada placa submetida a real time PCR. * significa uma expressão diferencial com p -value < 0,05, determinada pelo REST Para cada gene a expressão foi determinada contra o calibrador interno proteína 42 de controlo da divisão celular.

7.4.1 Fosfatases ácido roxas

As enzimas fosfatases ácido roxas (PAP; EC 3.1.3.2) são metalofosfoesterases que hidrolisam ligações éster de fosfato numa grande gama de substratos. As PAPs apresentam isoformas que são expressas em diferentes localizações e possuem funções distintas. Estas características contribuem para a variabilidade de processos biológicos aos quais as PAPs estão envolvidas²²⁴. Estas enzimas são extensivamente estudadas em planta dada a importância no seu metabolismo. Algumas PAPs de plantas apresentam semelhança a PAPs de mamíferos²²⁵, enquanto que outras apresentam características particulares de planta²²⁴. Para além dos mamíferos, a função das PAPs em animais continua por elucidar.

Diversas funções biológicas das PAPs foram propostas até hoje. As PAPs de mamíferos têm sido associadas ao transporte de ferro, geração de ROS como resposta de defesa e no aumento da reabsorção óssea, enquanto em plantas são geralmente associadas à sequestração e transporte de fosfato orgânico a partir dos solos²²⁶. A submissão das sequências codificantes das 3 PAPs identificadas em um BLASTP contra a base de dados curada Swiss-Prot gerou resultados similares. Para as três sequências as melhores correspondências corresponderam a homólogos de *M. musculus*, *Danio rerio* e *H. sapiens*, com E-value médio entre as anotações das três sequências de $6,67e^{-122}$, $1,33e^{-118}$ e $1,33e^{-115}$, respetivamente. Tendo em conta a maior homologia das sequências detetadas no nosso estudo face a PAPs de animais e considerando potencial envolvimento das PAPs no mecanismo de patogenicidade do NMP, destaca-se o facto de estas enzimas, em animais, poderem promover a geração de ROS²²⁶. O mecanismo aceite consiste na capacidade da PAP reagir com o peróxido de hidrogénio e produzir espécies reativas como o radical hidroxilo²²⁷. Assim a secreção de PAPs para o meio extracelular poderá contribuir para um aumento do stress oxidativo da planta, para além dos ROS endógenos produzidos como resposta de defesa face à invasão pelo nemátode. Esta sugestão ganha importância pelo facto das 3 sequências codificantes das PAPs identificadas apresentarem a presença de peptídeo sinal e ausência de TM, indicando a potencialidade de serem secretadas para o exterior do nemátode.

Os resultados da avaliação da expressão relativa destas enzimas, apresentados na Figura 15, confirmam as indicações *in silico* fornecidas pelo Myrna, na medida em que as 3 formas da enzima apresentam diferenças de expressão entre as diferentes amostras (Tabela 18). Os resultados obtidos mostram a importância das 3 PAPs em todos os

estágios de *B. xylophilus* crescidos em pinheiro apresentando todos uma sobre-expressão dos respectivos genes face a *B. xylophilus* crescido em fungo. As fêmeas e os juvenis apresentam uma sobre-expressão nas 3 PAPs sempre superior a 8 vezes, enquanto o macho apenas na PAP3 apresenta uma sobre-expressão superior a 2 vezes. Estes resultados indicam a maior ativação destes genes em fêmeas e juvenis, demonstrando a sua potencial ação no ataque à planta. Adicionalmente, pode-se concluir que a fêmea é dos 3 tipos de NMP a que maior ação exerce através das PAPs apresentando uma expressão das 3 formas da enzima significativamente superior aos outros nemátodes crescidos em pinheiro.

O nível de sobre-expressão das PAPs, face ao nemátode crescido em fungo, sugere o envolvimento destas enzimas no mecanismo de patogenicidade do NMP, com especial atenção à PAP3 (Figura 15). Os diferentes níveis de expressão entre as 3 enzimas também contribuem para a hipótese de que as 3 sequências selecionadas para estudo codificam 3 formas de PAPs e com ações particulares. Estas diferenças podem estar relacionadas com a variabilidade destas enzimas em plantas, em que o facto de possuírem enzimas homólogas a PAPs de animais não exclui a hipótese de alguma destas 3 formas em estudo estar relacionada com uma ação de mimetização e contribuir, assim, para o mecanismo de patogenicidade do NMP.

Os substratos destas enzimas serão um alvo de estudo muito interessante, podendo revelar uma importante interação entre estas proteínas e moléculas importantes para a capacidade de defesa da planta.

7.4.2 Proteína 44 residente do retículo endoplasmático

A proteína 44 residente do retículo endoplasmático (ERp44) é membro da família de proteínas dissulfeto isomerases²²⁸. Estas oxiredutases localizadas no RE desempenham funções importantes no arranjo conformacional final e na atividade biológica de muitas proteínas secretadas²²⁹. Geralmente, as proteínas complexas necessitam de isomerização das ligações dissulfeto para atingir a sua estrutura nativa e, conseqüentemente, ficarem funcionalmente ativas. Em eucariotas, o rearranjo estrutural de proteínas ocorre no RE, onde as oxiredutases formam ligações dissulfeto com as proteínas em rearranjo, permitindo a isomerização das ligações intramoleculares da proteína e a conseqüente, reorganização conformacional até atingir maior estabilidade estrutural (estrutura nativa)²²⁹. Assim, considera-se que a proteína ERp44 atua no

controle de qualidade no RE, participando no rearranjo conformacional de proteínas e prevenindo a secreção de proteínas sem conformação funcional²³⁰, como no caso da imunoglobulina M, da adiponectina e do recetor SERT da serotonina²³¹. Estes estudos sugerem que a ERp44 é importante na montagem de oligómeros²³¹. Existem evidências que a ERp44 é induzida durante o stress do RE²²⁹. Os níveis de stress estão associados à acumulação de proteínas não nativas no organelo.

A previsão da presença de um peptídeo sinal na sequência do transcrito BxPt17_MFJ_002275 (Tabela 18), anotado como ERp44, está de acordo com as características estruturais das sequências destas proteínas que são secretadas²²⁹. O processo de controle da qualidade do arranjo conformacional de proteínas no RE deverá ser homólogo entre os eucariotas pois constitui um processo biológico de extrema importância para a homeostase dos organismos. O produto do transcrito BxPt17_MFJ_002275 pode exercer uma função importante na capacidade do nemátode secretar proteínas funcionais, essenciais para a indução da infecção no hospedeiro, ou na redução do stress causado pela resposta do pinheiro à presença dos nemátodes. O seu envolvimento na regulação da eficiência do secretoma²³² aponta a ERp44 como um interessante alvo de estudo.

Os resultados de RT-qPCR demonstraram a sobre-expressão da ERp44 em fêmeas face às restantes amostras, obtendo uma expressão relativa superior a 7 vezes face aos nemátodes crescidos em fungo (Figura 15). Este resultado poderá indicar um nível superior de stress do RE em fêmeas. Diferentemente ou de forma conjugada, a sobre-expressão do gene em fêmeas também poderá indicar a maior necessidade das fêmeas secretarem proteínas efectoras.

A sobre-expressão da ERp44 pode indicar a necessidade do nemátode secretar os substratos desta enzima, entre eles a adiponectina e o recetor SERT da serotonina²³¹. A adiponectina está envolvida em processos biológicos como a regulação da homeostase da energia celular e a tolerância à glucose²³³. Svensson e colaboradores²³⁴ demonstraram que a adiponectina apresenta estas funções em *C. elegans*. Estes processos são potencialmente importantes no parasitismo na medida em que os nemátodes apresentam grande ativação metabólica para a migração ao longo da planta, interação com o hospedeiro na produção de mecanismos de ataque e defesa, assim como, na sobrevivência em condições pouco favoráveis. Quanto ao SERT, existem evidências que as alterações moleculares na sua estrutura melhoram a sua função de se ligar extracelularmente ao neurotransmissor serotonina, aumentando o efeito biológico

deste nos neurónios e tecidos periféricos²³⁵. Em *C. elegans*, a serotonina está associada à resposta a estímulos externos como a acessibilidade de alimento, na qual promove a diminuição da locomoção do nemátode em ambientes favoráveis à nutrição¹⁹¹.

Os resultados obtidos na quantificação da expressão da ERp44 sugerem a potencialidade das fêmeas, no início da etapa avançada de desenvolvimento da doença, possuírem maior necessidade de energia celular, usufruindo de maior acesso a alimento. Este poderá estar possivelmente associado ao acesso ao tecido vascular da planta que é iniciado nesta fase da doença. Esta maior necessidade poderá estar relacionada com a reprodução e manutenção da população de nemátodes.

7.4.3 Proteína 1 de ligação ao retinol e ácidos gordos

As proteínas FARs (de “fatty acid and retinoid binding protein”) têm sido bastante investigadas em nemátodes parasitas de animais e de plantas, como *Onchocerca volvulus*²³⁶ e *G. pallida*²³⁷, respetivamente. Em nemátodes, as FARs interagem com ácidos gordos e retinol promovendo a sua absorção, transporte e localização específica²³⁸. Os nemátodes parasitas de plantas, durante o seu desenvolvimento e infeção do hospedeiro, necessitam de ácidos gordos e retinol para a biossíntese e anabolismo de macromoléculas²³⁹. O retinol possui ainda uma ação importante na ativação de genes, na sinalização celular e diferenciação e na reparação de tecidos^{238,240}. No entanto, estes nemátodes são incapazes de sintetizar ácidos gordos e retinol, necessitando de obter estes metabolitos a partir dos seus hospedeiros e do ambiente em seu redor através de proteínas como as FARs²⁴¹. Assim, as FARs secretadas pelos nemátodes parasitas podem permitir ao nemátode obter lípidos nutritivos a partir do hospedeiro, infetá-lo e inibir o mecanismo de defesa deste²³⁹. Os genes FAR constituem um bom alvo de controlo de nemátodes pois não existem em outros organismos²³⁹.

Prior e colaboradores²⁴² identificaram pela primeira vez um gene *far* em nemátodes parasitas de plantas, em *G. pallida*. A proteína FAR liga-se a ácidos linolénico e linoleico, que são precursores de compostos de plantas e da via de sinalização do ácido jasmónico, concluindo a sua participação no mecanismo de defesa do nemátode²⁴². Cheng e colaboradores²³⁹ reportaram a presença de uma FAR no nemátode parasita de plantas *Aphelenchoides besseyi*. Este nemátode pertence à mesma

ordem que *B. xylophilus*, a ordem *Aphelenchida* e sendo esta proteína exclusiva de nemátodes²³⁹, a caracterização funcional da FAR-1 em *A. besseyi* poderá representar uma importante fonte de conhecimento sobre a ação da proteína em *B. xylophilus*. Este grupo reportou que a FAR-1 em *A. besseyi* é potencialmente secretada devido à presença de um peptídeo-sinal²³⁹, o que está de acordo com a previsão da presença deste tipo de estruturas na FAR-1 de *B. xylophilus*. Os resultados indicaram a presença de um peptídeo-sinal e a ausência de um domínio transmembranar na estrutura primária da proteína no NMP (Tabela 18). Tal como em *G. pallida*²⁴², também em *A. besseyi*, foi demonstrado que a proteína está presente na hipoderme do nemátode, sendo sugerida a sua ação na utilização de ácidos gordos do hospedeiro para manutenção das necessidades metabólicas²³⁹. A localização da proteína na hipoderme também levantou a hipótese de esta neutralizar os produtos da reação de defesa da árvore e assumir um efeito efetivo no parasitismo²³⁹. Os autores do estudo ainda demonstraram que o RNAi do gene diminuiu a capacidade de infeção do nemátode, suportando a sugestão de que a FAR-1 exerça uma função de ligação ao retinol pois este é essencial para o desenvolvimento embrionário e reprodução em *A. besseyi*²³⁹. As importantes funções das FARs no mecanismo de patogenicidade definiram o gene *far-1* como um efetivo alvo para o controlo de nemátodes parasitas de plantas^{239,243}.

Os resultados de RT-qPCR, apresentado na Figura 15, mostraram uma ligeira sobre-expressão do gene em machos e fêmeas e ligeira sub-expressão em juvenis, sugerindo que em *B. xylophilus* este mecanismo não é muito relevante para a infeção da planta nem para a sobrevivência do nemátode.

Estes resultados não estão de acordo com os dados da expressão diferencial do gene *far-1* em *A. besseyi* em que as fêmeas apresentaram maior expressão face aos machos e juvenis²³⁹. Esta diferença pode estar relacionada com o facto das fêmeas de *A. besseyi* se reproduzirem por partenogénese, relegando para segundo plano o papel do macho no parasitismo²³⁹. Assim, a diferença dos resultados pode dever-se às diferenças no mecanismo de parasitismo dos nemátodes e a influência das diversas formas de vida deste nesse mecanismo.

Apesar dos resultados, o facto de este gene ser expresso nas diferentes fases de desenvolvimento de *B. xylophilus* identifica as FAR como um potencial alvo de controlo do nemátode.

7.5 Trealase

O dissacarídeo trealose está presente em muito organismos, tendo sido demonstrada a sua presença em nemátodes parasitas de plantas, parasitas de animais e não patogénicos²⁴⁴. Do nosso conhecimento, até à data, não existe nenhuma referência à presença de trealose no NMP. Este açúcar está presente em todos os estágios do ciclo de vida de *C. elegans*, em maior quantidade nos ovos e nos juvenis *dauer*, que correspondem aos estágios mais resistentes a condições de stress²⁴⁵.

A trealose tem sido proposta como essencial em diversos processos biológicos em nemátodes como reserva de energia, agente de proteção em condições de stress^{246,247} e no mecanismo de eclosão dos ovos²⁴⁸. A ação de proteção da trealose está relacionada com a preservação das membranas lipídicas e estabilização de proteínas no seu estado nativo²⁴⁷. Inicialmente era aceite que a trealose teria uma importante ação na proteção proteica contra a dessecação. Posteriormente, também ficou provada o envolvimento da trealose na retenção da conformação nativa de proteínas quando sujeitas a elevadas temperaturas, evitando a sua agregação²⁴⁷.

A enzima trealase (TRE) hidrolisa as ligações α,α -1,1-glicosídeo degradando a trealose em duas unidades de α -glicose. A ação desta enzima ganha destaque devido ao seu envolvimento no metabolismo da trealose em nemátodes parasitas²⁴⁹. O facto de a trealose não estar presente ou não revelar uma ação importante em hospedeiros de nemátodes parasitas como os mamíferos, as enzimas envolvidas no seu metabolismo em nemátodes representam bons alvos para o desenvolvimento de estratégias de controlo desses²⁴⁹. Dmitryjuk e colaboradores caracterizaram molecularmente duas trealases de *A. suum*, identificando uma trealase citossólica neutra responsável pela hidrólise de trealose intracelular e uma trealase ácida associada à membrana citoplasmática que hidrolisa o açúcar presente nos espaços extracelulares²⁴⁹.

A trealase estudada em *B. xylophilus* foi identificada pela sequência BxPt17_MFJ_001290 (Tabela 18). Esta obteve, por BLASTP, a anotação de trealase e foi anotada como pertencente à família de peptidases GH37 (Tabela 18), a qual representa na base de dados de CAZymes a família da trealase (EC 3.2.1.28). A proteína identificada codifica potencialmente uma trealase intracelular, tendo em conta a ausência de peptídeo sinal na sequência BxPt17_MFJ_001290 (Tabela 18).

Os resultados apresentados na Figura 16 mostram as diferenças de expressão da enzima TRE estudada entre as amostras em estudo. Foram detetadas diferenças

estatisticamente significativas nas três formas de vida de *B. xylophilus* crescido em planta. Os machos foram os únicos que evidenciaram a sobre-expressão da enzima face a *B. xylophilus* crescido em fungo, enquanto as fêmeas e JIII sub-expressaram a enzimas a nível comparativo com a amostra calibradora (Figura 16). Estes resultados estão de acordo com a indicação do Myrna pois a expressão relativa quantificada entre as amostras de *B. xylophilus* crescido em planta são estatisticamente diferentes.

Os resultados de RT-qPCR das fêmeas e JIII (Figura 16) estão de acordo com o potencial ação da trealose no mecanismo de resposta de nemátodes a estímulos de stress exógenos, na medida em que a acumulação de trealose poderá promover a estabilização de estruturas proteicas intracelularmente. Esta evidência é de extrema importância pois elucida um novo mecanismo pelo qual o nemátode *B. xylophilus* poderá ultrapassar as condições de stress experienciadas durante a indução do parasitismo. Esta conclusão é suportada pela sugestão da ativação do mecanismo em outros nemátodes parasitas como resposta a condições de stress²⁴⁷ e pela presença de trealose em outros nemátodes parasitas de plantas (revisto em²⁴⁴).

Os resultados da expressão da TRE em *B. xylophilus* machos crescidos em planta (Figura 16) indicam a sobre-expressão em cerca de 4 vezes mais em comparação com *B. xylophilus* crescido em fungo e, conseqüentemente, cerca de 5 vezes maior face às restantes amostras do NMP crescido em planta. Este resultado indica que o nemátode tem o metabolismo da trealose muito ativo, no entanto a sobre-expressão da enzima de degradação não implica diferentes níveis do açúcar intracelularmente, em comparação com as restantes amostras. Assim, este resultado pode sugerir uma resposta mais intensa às condições de stress que despoletam a reação no nemátode de produzir trealose. Desta forma o estudo da ação da enzima TRE e, conseqüente, ativação do metabolismo da trealose poderá elucidar importantes respostas celulares nos nemátodes e as respetivas interações moleculares. A utilização desta via metabólica como potencial alvo para controlo do nemátode também suporta o interesse na sua elucidação.

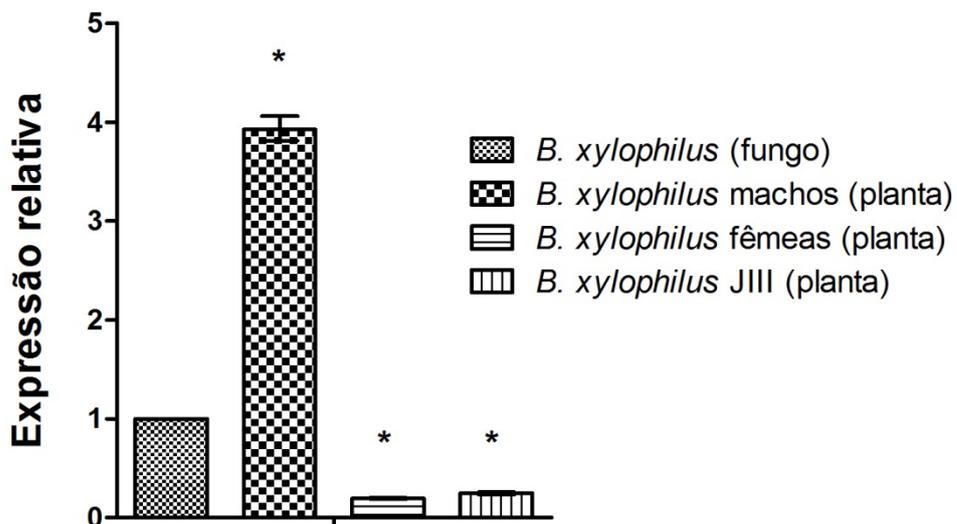


Figura 16 - Resultados RT-qPCR da trealase. A expressão da trealase é mostrada relativamente à amostra calibradora, *B. xylophilus* crescido em fungo. Os dados estão apresentados na forma de média±limites, com n=3 a nível de poço em cada placa submetida a real time PCR. * significa uma expressão diferencial com $p\text{-value} < 0,05$, determinada pelo REST Para cada gene a expressão foi determinada contra o calibrador interno proteína 42 de controlo da divisão celular.

Conclusões

Os objetivos propostos foram alcançados com sucesso validando o esquema de trabalho, quer *in silico* como experimental. A sequenciação dos transcritomas de *B. xylophilus* e *B. mucronatus* crescidos em fungo e de machos, fêmeas e JIII de *B. xylophilus* crescidos em pinheiro permitiram a recolha de mais de 800 Mb de informação biológica sobre o nemátode-da-madeira-do-pinheiro *B. xylophilus* e da espécie filogeneticamente próxima *B. mucronatus*. Esta informação foi organizada numa plataforma de transcritômica comparativa, permitindo a realização de pesquisas de acordo com as respostas biológicas procuradas.

A integração de diversas abordagens de anotação *in silico* como o InterPro, Merops, CAT, KEGG, entre outros, permitiram a caracterização funcional dos transcritos presentes em cada transcritoma sequenciado e, conseqüentemente, a reunião da respetiva informação biológica. Foi obtido um nível de anotação funcional de 60% em média para cada transcritoma, evidenciado a qualidade de informação biológica gerada. Este resultado está de acordo com o nível de anotação funcional obtido por outros grupos para o transcritoma de *B. xylophilus*⁴², assim como na anotação de transcritomas de outros nemátodes parasitas de plantas¹³⁶. Os 40% dos transcritos não anotados representam a especificidade genética destes nemátodes, assim como, os potenciais eventos de origens independentes de parasitismo a que estes podem estar associados. A informação funcional foi integrada na plataforma, permitindo a pesquisa de grupos de genes com potencialidade de atuarem no mecanismo de patogenicidade de *B. xylophilus*.

A integração das ferramentas de transcritômica comparativa CD-Hit e Myrna permitiram o estudo dos transcritos sequenciados e da respetiva informação biológica sob diferentes perspetivas. O CD-Hit permitiu, através da organização das sequências em *clusters* com base na sua similaridade, diminuir a quantidade de informação a analisar, reduzindo a redundância dos transcritomas e potenciando a comparação integrada destes. Desta comparação obtiveram-se grupos de sequências com importante potencial biológico como as sequências específicas de *B. xylophilus* face a *B. mucronatus*, ou ainda de genes ativos no NMP, mas somente expressos em planta. A filtração da informação gerada foi integrada com a análise de expressão diferencial gerada pelo Myrna para a identificação individual de genes de interesse, como os associados ao metabolismo do homogentisato (Figura 13). O nível de expressão das enzimas 4HPPD, HGD, MAI e FAH foi avaliado experimentalmente por RT-qPCR.

A expressão diferencial gerada pelo Myrna foi explorada no sentido de analisar o conjunto de sequências com indicação de serem diferencialmente expressas com um *p-value* inferior a $5e^{-5}$ entre os transcritomas de *B. xylophilus* crescido em pinheiro. A sua análise evidenciou 1.845 genes cujo conteúdo biológico presente na plataforma, resultante das várias abordagens de caracterização utilizadas, foi analisado. Foram, assim identificados três conjuntos de genes com potencialidade de codificarem proteínas envolvidas no mecanismo de patogenicidade do NMP. No total, oito peptidases, cinco enzimas potencialmente secretadas por *B. xylophilus* e uma CAZyme foram analisadas por RT-qPCR para a quantificação do seu nível de expressão relativo.

As potencialidades do desenho experimental utilizado e a sua validação perante os objetivos propostos foram avaliadas pelo estudo de genes aceites pela comunidade científica como potencialmente envolvidos no parasitismo do NMP. A expressão relativa de dez genes associados ao mecanismo de destoxificação oxidativo ou considerados efetores do parasitismo foi analisada por RT-qPCR.

Os resultados mais relevantes estão associados às diferenças de expressão mais acentuadas entre as populações de *B. xylophilus* crescidos em fungo e planta. Nas enzimas de destoxificação oxidativa, os resultados da expressão diferencial de glutationa peroxidase, superóxido dismutase e catalase entre as duas espécies em estudo (Figura 11) revelaram que existem diferenças na resposta a condições de stress oxidativo. Esta indicação demonstra a importância destas enzimas na tolerância e destoxificação dos nemátodes perante o stress oxidativo a que estão sujeitos na planta e, subsequentemente, na diferente capacidade de parasitismo das duas espécies de nemátodes. É ainda de realçar a expressão do gene *gpx* em JIII (Figura 11) crescido em planta, que suporta a evidência da respetiva proteína potencialmente exercer uma ação importante na sobrevivência do nemátode nas condições experienciadas na planta. Isto considerando a evidência que a GPX estudada não é potencialmente expressa pelo estágio dispersivo JIV⁸⁶.

O metabolismo do homogentisato foi evidenciado pela ativação diferencial entre os organismos *B. xylophilus* e *B. mucronatus*. O potencial papel do homogentisato na diminuição do stress oxidativo revela que a possível acumulação deste composto em nemátodes machos durante o parasitismo do pinheiro (Figura 13) pode induzir um mecanismo específico desta forma de vida de *B. xylophilus*. A acumulação do homogentisato está de acordo com a maior ativação da catalase em machos (Figura 13). Este resultado ganha importância pelo facto de constituir um mecanismo pouco

estudado em nemátodes, representando uma evidência que suporta a hipótese do parasitismo de *B. xylophilus* ter surgido de forma independente do processo evolutivo⁸⁶.

Nas restantes enzimas conhecidas como envolvidas no parasitismo de *B. xylophilus*, os genes que codificam GHF 16, PEL e VAP-2 foram mais expressos nos nemátodes crescidos em planta (Figura 12). O grande nível de sobre-expressão da GHF16 em estudo revela que está extremamente ativa em *B. xylophilus* durante o parasitismo (Figura 12) e a evidência da sua origem de proveniência bactéria via HGT⁸⁶ torna este gene um alvo interessante para o controlo do nemátode. Considerando os resultados da expressão das sequências codificantes de efetores secretados (Figura 12), onde as fêmeas apresentaram de forma geral uma maior expressão face às outras formas de vida crescidas em planta, a sub-expressão das glicosil hidrolases das famílias 45 e 16 é muito interessante. Apesar da ação das proteínas alergénicas não estar elucidada em nemátodes parasitas de plantas, a sobre-expressão da VAP-2 em machos (Figura 12) revela que esta poderá ser importante nas interações do nemátode com o pinheiro hospedeiro. Os nossos resultados constituem também uma fonte de comparação perante outros estudos incidentes nestas proteínas, permitindo aumentar a informação biológica sobre a sua ação.

As enzimas com o potencial de serem secretadas pelo nemátode constituem um grupo de proteínas com especial interesse no ponto de vista das interações entre nemátode-hospedeiro que podem catalisar. Os genes codificantes para as fosfatases ácido roxas apresentaram grandes níveis de sobre-expressão nos nemátodes crescidos em planta (Figura 15). A identificação de 3 sequências diferentes está de acordo com os diferentes níveis de expressão (Figura 15). A consistência do padrão de expressão entre as formas de vida de *B. xylophilus* crescido em planta revelam que podem estar associadas a processos biológicos similares e o nível de expressão potencia que estes sejam importantes para o nemátode. A elucidação do substrato destas enzimas poderá revelar importantes avanços no conhecimento do mecanismo de patogenicidade do NMP.

O grupo das peptidases identificadas é bastante importante no parasitismo de nemátodes parasitas de plantas⁸⁸ e os níveis de expressão determinados (Figura 14) revelam o interesse em genes como CAT L e CPI 5. As catepsinas são importantes na nutrição dos nemátodes parasitas de animais mas a expressão da CAT L identificada em JIII sugere que este não seja o processo biológico para o qual a sua grande ativação contribui. A utilização das catepsinas como genes de controlo de nemátodes parasitas de

animais²⁵⁰ potencia a utilização desta enzima para o efeito em nemátodes parasitas de plantas, constituindo um importante alvo para futuras investigações. A sobre-expressão do mRNA para o inibidor de proteases cisteínicas CPI 5 constitui um resultado muito interessante a vários níveis. Este inibidor poderá ser específico de JIII, uma etapa larval especializada na sobrevivência em condições adversas³⁰ e apresenta evidência de ser potencialmente secretada (Tabela 18). Adicionalmente, a sua similaridade com proteínas de plantas sugere o possível envolvimento em interações com o hospedeiro, visando o estabelecimento de uma ação de mimetização durante o parasitismo. A avaliação da possível interação poderá elucidar um mecanismo pelo qual *B. xylophilus* influencia o metabolismo do hospedeiro.

Em conclusão, os resultados gerados neste estudo permitiram levantar questões biológicas sobre o mecanismo de parasitismo de *B. xylophilus* e identificar alvos com potencialidade de desempenharem funções determinantes para o sucesso deste mecanismo. A análise dos níveis de expressão diferencial entre as amostras em estudo permitiu a identificação de genes cuja importância biológica deve ser avaliada. A utilização de estratégias experimentais como a localização da expressão do mRNA e da proteína, o seu silenciamento durante o parasitismo, a produção de proteínas recombinantes e a identificação dos substratos correspondentes à sua função apresenta a potencialidade de estas revelarem importantes questões biológicas como a função e integração destes alvos no mecanismo de parasitismo do nemátode. Os resultados destas estratégias poderão revelar a potencialidade de alguns destes genes serem utilizados no controlo de *B. xylophilus* durante o parasitismo.

Referências

- 1 Organization, E. a. M. P. P. www.eppo.int, 2013.
- 2 Buhner, G. S. a. E. M. *Aphelenchoides xylophilus* n. sp., a nematode associated
with blue-stain and other fungi in timber. *Journal of agricultural research* **48**,
949-951 (1934).
- 3 Yano, M. Investigation on the cause of pine mortality in Nagasaki Prefecture.
Sanrinkoho **4**, 1-14 (1913).
- 4 Tokushige, T. K. Y. Inoculation experiments of a nematode, *Bursaphelenchus*
sp., onto pine trees. *Journal of the Japanese Forestry Society* **53**, 210-218
(1971).
- 5 Mamiya, Y. & Kiyohara, T. Description of *Bursaphelenchus lignicolus* n. sp.
(Nematoda: Aphelenchoididae) from pine wood and histopathology of
nematode-infested trees. *Nematologica* **18**, 120-124 (1972).
- 6 Nickle, W. R., Golden, A. M., Mamiya, Y. & Wergin, W. P. On the Taxonomy
and Morphology of the Pine Wood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*
(Steiner & Buhner 1934) Nickle 1970. *Journal of nematology* **13**, 385-392
(1981).
- 7 Tares, S., Abad, P., Bruguier, N. & Deguiran, G. Identification and Evidence for
Relationships among Geographical Isolates of *Bursaphelenchus* Spp (Pinewood
Nematode) Using Homologous DNA Probes. *Heredity* **68**, 157-164, doi:Doi
10.1038/Hdy.1992.24 (1992).
- 8 Dwinell, L. D. & Nickle, W. R. *An overview of the pine wood nematode ban in*
North America. (U.S.D.A., 1989).
- 9 Hasegawa, K., Mota, M. M., Futai, K. & Miwa, J. Chromosome structure and
behaviour in *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae)
germ cells and early embryo. *Nematology* **8**, 425-434,
doi:10.1163/156854106778493475 (2006).
- 10 Futai, K. in *Pine Wilt Disease* (ed Kazuyoshi Futai Bo Guang Zhao, Jack R.
Sutherland and Yuko Takeuchi) Ch. Part I Historical Overview, 2-4 (Springer,
2008).
- 11 H. Cheng, M. L., W. Li & z. Fang. The occurrence of a pine wilting disease
caused by a nematode found in Nanjing. *Forest Pest and Disease*, 1-5 (1983).
- 12 Zhao, B. G. in *Pine Wilt Disease* (ed Kazuyoshi Futai Bo Guang Zhao, Jack R.
Sutherland and Yuko Takeuchi) 18-25 (Springer, 2008).
- 13 Yi C. , B. B., Park J., Yang S. & Chang K. Investigations on pathogenicity,
invasion biology and population dynamics of the Pine Wood Nematode
Bursaphelenchus xylophilus (Steiner und Buhner 1934) Nickle 1970 in European
conifers. *Research Reports of the Forestry Research Institute Seoul* **38**, 141-149
(1989).
- 14 Kwon, T.-S., Shin, J. H., Lim, J.-H., Kim, Y.-K. & Lee, E. J. Management of
pine wilt disease in Korea through preventative silvicultural control. *Forest*
Ecology and Management **261**, 562-569, doi:10.1016/j.foreco.2010.11.008
(2011).
- 15 Mota, M. M. *et al.* First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in
Europe. *Nematology* **1**, 727-734 (1999).
- 16 Rodrigues, J. M. in *Pine Wilt Disease: A Worlwide Threat to Forest Ecosystems*
(ed Manuel M. Mota e Paulo Vieira) (Springer, 2008).
- 17 Rodrigues, J. M. Estratégia, ações e resultados. (Ministério da Agricultura, do
Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território/Autoridade Florestal
Nacional, Portugal, 2012).

- 18 Abelleira, A., Picoaga, A., Mansilla, J. P. & Aguin, O. Detection of *Bursaphelenchus xylophilus*, Causal Agent of Pine Wilt Disease on *Pinus pinaster* in Northwestern Spain. *Plant Disease* **95**, 776-776, doi:10.1094/pdis-12-10-0902 (2011).
- 19 INE, I. P. Estatísticas Agrícolas 2011. (Instituto Nacional de Estatística, Lisboa-Portugal, 2012).
- 20 Soliman, T. *et al.* Framework for Modelling Economic Impacts of Invasive Species, Applied to Pine Wood Nematode in Europe. *PLoS ONE* **7**, e45505, doi:10.1371/journal.pone.0045505 (2012).
- 21 Kikuchi, T. *et al.* Genomic Insights into the Origin of Parasitism in the Emerging Plant Pathogen *Bursaphelenchus xylophilus*. *PLoS Pathog* **7**, e1002219, doi:10.1371/journal.ppat.1002219 (2011).
- 22 Aikawa, T. in *Pine Wilt Disease* (ed Kazuyoshi Futai Bo Guang Zhao, Jack R. Sutherland and Yuko Takeuchi) 123-138 (Springer, 2008).
- 23 Suzuki, K. in *Encyclopedia of Forest Sciences* (ed Burley Editor-in-Chief: Jeffery) 773-777 (Elsevier, 2004).
- 24 Perry, R. N. & Moens, M. *Plant nematology*. (CABI, 2006).
- 25 Sriwati, R. (eds Bo Guang Zhao, Kazuyoshi Futai, Jack R. Sutherland, & Yuko Takeuchi) 274-285 (Springer Japan, 2008).
- 26 Teale, S. A. *et al.* A Male-Produced Aggregation Pheromone of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae), a Major Vector of Pine Wood Nematode. *Journal of Economic Entomology* **104**, 1592-1598, doi:10.1603/ec11076 (2011).
- 27 Linit, M. J. Nematode-Vector Relationships in the Pine Wilt Disease System. *The journal of nematology* **20**, 227-235 (1988).
- 28 Sousa, E. *et al.* *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda; Aphelenchoididae) associated with *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera; Cerambycidae) in Portugal. *Nematology* **3**, 89 (2001).
- 29 Maehara, N. & Futai, K. Population changes of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae), on fungi growing in pine-branch segments. *Applied Entomology and Zoology* **35**, 413-417 (2000).
- 30 Kondo, E. & Ishibashi, N. Ultrastructural Differences between the Propagative and Dispersal Forms in Pine Wood Nematode, *Bursaphelenchus lignicolus*, with Reference to the Survival. *Applied Entomology and Zoology* **13**, 1-11 (1978).
- 31 Mamiya, Y. Effects of Fatty Acids Added to Media on the Population Growth of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda : Aphelenchoididae). *Applied Entomology and Zoology* **25**, 299-309 (1990).
- 32 Necibi, S. & Linit, M. J. Effect of *Monochamus carolinensis* on *Bursaphelenchus xylophilus* Dispersal Stage Formation. **30**, 246-254 (1998).
- 33 Stamps, W. T. & Linit, M. J. Interaction of intrinsic and extrinsic chemical cues in the behaviour of *Bursaphelenchus xylophilus* (Aphelenchida: Aphelenchoididae) in relation to its beetle vectors. *Nematology* **3**, 295 (2001).
- 34 Kondo, E. SEM Observations on the Intratracheal Existence and Cuticle Surface of the Pine Wood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, Associated with the Cerambycid Beetle, *Monochamus carolinensis*. *Applied Entomology and Zoology* **21**, 340-346 (1986).
- 35 Aikawa, T. & Togashi, K. An effect of pine volatiles on departure of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda : Aphelenchoididae) from *Monochamus alternatus* (Coleoptera : Cerambycidae). *Applied Entomology and Zoology* **33**, 231-237 (1998).

- 36 Naves, P. M., Camacho, S., de Sousa, E. M. & Quartau, J. A. Transmission of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* through feeding activity of *Monochamus galloprovincialis* (Col., Cerambycidae). *Journal of Applied Entomology* **131**, 21-25, doi:10.1111/j.1439-0418.2006.01111.x (2007).
- 37 Edwards, O. R. & Linit, M. J. Transmission of *Bursaphelenchus xylophilus* through Oviposition Wounds of *Monochamm carolinensis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Journal of nematology* **24**, 133-139 (1992).
- 38 Ishikawa, M., Shuto, Y. & Watanabe, H. beta-Myrcene, a potent attractant component of pine wood for the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Agricultural and biological chemistry* **50**, 1863-1866 (1986).
- 39 Stamps, W. T. & Linit, M. J. Neutral Storage Lipid and Exit Behavior of *Bursaphelenchus xylophilus* Fourth- stage Dispersal Juveniles from their Beetle Vectors. *Journal of nematology* **30**, 255-261 (1998).
- 40 Haegeman, A., Jones, J. T. & Danchin, E. G. Horizontal gene transfer in nematodes: a catalyst for plant parasitism? *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **24**, 879-887, doi:10.1094/MPMI-03-11-0055 (2011).
- 41 Jones, J. T., Furlanetto, C. & Kikuchi, T. Horizontal gene transfer from bacteria and fungi as a driving force in the evolution of plant parasitism in nematodes. *Nematology* **7**, 641-646, doi:10.1163/156854105775142919 (2005).
- 42 Yan, X. *et al.* Comparative transcriptomics of two pathogenic pinewood nematodes yields insights into parasitic adaptation to life on pine hosts. *Gene* **505**, 81-90, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.05.041 (2012).
- 43 Davis, E. L., Hussey, R. S., Mitchum, M. G. & Baum, T. J. Parasitism proteins in nematode-plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 360-366, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2008.04.003 (2008).
- 44 Kikuchi, T. in *Pine Wilt Disease* (eds BoGuang Zhao, Kazuyoshi Futai, Jack R Sutherland, & Yuko Takeuchi) Ch. 10, 67-80 (Springer Japan, 2008).
- 45 Fukuda, K. Physiological process of the symptom development and resistance mechanism in pine wilt disease. *Journal of Forest Research* **2**, 171-181, doi:10.1007/bf02348216 (1997).
- 46 Hirao, T., Fukatsu, E. & Watanabe, A. Characterization of resistance to pine wood nematode infection in *Pinus thunbergii* using suppression subtractive hybridization. *BMC Plant Biology* **12**, 1-14, doi:10.1186/1471-2229-12-13 (2012).
- 47 Ichihara, Y., Fukuda, K. & Suzuki, K. Early symptom development and histological changes associated with migration of *Bursaphelenchus xylophilus* in seedling tissues of *Pinus thunbergii*. *Plant Dis* **84**, 675-680, doi:10.1094/pdis.2000.84.6.675 (2000).
- 48 Hara, N., Takeuchi, Y. & Futai, K. Cytological changes in ray parenchyma cells of seedlings of three pine species infected with the pine wilt disease. *Japanese Journal of Nematology* **36** (2006).
- 49 van Loon, L. C., Geraats, B. P. J. & Linthorst, H. J. M. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Science* **11**, 184-191, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2006.02.005 (2006).
- 50 Fukuda, K., Utsuzawa, S. & Sakaue, D. Correlation between acoustic emission, water status and xylem embolism in pine wilt disease. *Tree Physiology* **27**, 969-976 (2007).
- 51 Son, J., Komatsu, M., Matsushita, N. & Hogetsu, T. Migration of pine wood nematodes in the tissues of *Pinus thunbergii*. *Journal of Forest Research* **15**, 186-193, doi:10.1007/s10310-009-0171-3 (2010).

- 52 Kuroda, K. Monitoring of xylem embolism and dysfunction by the acoustic emission technique in *Pinus thunbergii* inoculated with the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Journal of Forest Research* **17**, 58-64, doi:10.1007/s10310-010-0246-1 (2012).
- 53 Kuroda, K. (eds Bo Guang Zhao, Kazuyoshi Futai, Jack R. Sutherland, & Yuko Takeuchi) 204-222 (Springer Japan, 2008).
- 54 Franceschi, V. R., Krokene, P., Christiansen, E. & Krekling, T. Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests. *New Phytologist* **167**, 353-376, doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01436.x (2005).
- 55 Mamiya, Y. in *Pine Wilt Disease: A Worldwide Threat to Forest Ecosystems* (eds Manuel Mota & Paulo Vieira) Ch. 27, 321-334 (Springer Netherlands, 2008).
- 56 Mamiya, Y. Scanning Electron Microscopy of Pine Seedling Wood Tissue Sections inoculated with Pinewood Nematode *Bursaphelenchus xylophilus* previously prepared for light microscopy. *Journal of nematology* **44**, 255-259 (2012).
- 57 Yamada, T. (eds Bo Guang Zhao, Kazuyoshi Futai, Jack R. Sutherland, & Yuko Takeuchi) 223-234 (Springer Japan, 2008).
- 58 Ikeda, T. Responses of water-stressed *Pinus thunbergii* to inoculation with avirulent pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*): water relations and xylem histology. *Journal of Forest Research* **1**, 223-226, doi:10.1007/bf02348329 (1996).
- 59 Hudgins, J. W., Ralph, S. G., Franceschi, V. R. & Bohlmann, J. Ethylene in induced conifer defense: cDNA cloning, protein expression, and cellular and subcellular localization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase in resin duct and phenolic parenchyma cells. *Planta* **224**, 865-877, doi:10.1007/s00425-006-0274-4 (2006).
- 60 Kuroda, K. Terpenoids causing tracheid-cavitation in *Pinus thunbergii* infested by pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **55**, 170-178 (1989).
- 61 Kuroda, K. Mechanism of cavitation development in the pine wilt disease. *European Journal of Forest Pathology* **21**, 82-89, doi:10.1111/j.1439-0329.1991.tb00947.x (1991).
- 62 Fukuda, K., Hogetsu, T. & Suzuki, K. Ethylene production during symptom development of pine-wilt disease. *European Journal of Forest Pathology* **24**, 193-202, doi:10.1111/1439-0329.ep11633745 (1994).
- 63 Kuroda, K., Yamada, T. & Ito, S. *Bursaphelenchus xylophilus* induced pine wilt: Factors associated with resistance. *European Journal of Forest Pathology* **21**, 430-438, doi:10.1111/j.1439-0329.1991.tb00780.x (1991).
- 64 Kuroda, K., Yamada, T. & Mineo, K. Effects of cavitation on the development of pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **54**, 606-615 (1988).
- 65 Umebayashi, T. *et al.* The Developmental Process of Xylem Embolisms in Pine Wilt Disease Monitored by Multipoint Imaging Using Compact Magnetic Resonance Imaging. *Plant physiology* **156**, 943-951 (2011).
- 66 Conchard, H., Holtta, T., Herbette, S., Delzon, S. & Mencuccini, M. New insights into the mechanisms of water-stress-induced cavitation in conifers. *Plant physiology* **151**, 949-954 (2009).

- 67 Ishida, K., Hogetsu, T., Fukuda, K. & Suzuki, K. Cortical responses in Japanese black pine to attack by the pine wood nematode. *Canadian Journal of Botany* **71**, 1399-1405, doi:10.1139/b93-168 (1993).
- 68 Zhao, B. G. & Li, R. G. (eds Bo Guang Zhao, Kazuyoshi Futai, Jack R. Sutherland, & Yuko Takeuchi) 250-259 (Springer Japan, 2008).
- 69 Zhao, B. G., Liu, Y. & Lin, F. Effects of Bacteria Associated with Pine Wood Nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) on Development and Egg Production of the Nematode. *Journal of Phytopathology* **155**, 26-30, doi:10.1111/j.1439-0434.2006.01188.x (2007).
- 70 Zhu, L. H. *et al.* Pathogenicity of aseptic *Bursaphelenchus xylophilus*. *PLoS ONE* **7**, e38095, doi:10.1371/journal.pone.0038095 (2012).
- 71 Han, Z. M., Hong, Y. D. & Zhao, B. G. A Study on Pathogenicity of Bacteria Carried by Pine Wood Nematodes. *Journal of Phytopathology* **151**, 683-689, doi:10.1046/j.1439-0434.2003.00790.x (2003).
- 72 Zhao, B. G., Wang, H. L., Han, S. F. & Han, Z. M. Distribution and pathogenicity of bacteria species carried by *Bursaphelenchus xylophilus* in China. *Nematology* **5**, 899-906, doi:10.1163/156854103773040817 (2003).
- 73 Zhao, B. G. & Lin, F. Mutualistic symbiosis between *Bursaphelenchus xylophilus* and bacteria of the genus *Pseudomonas*. *Forest Pathology* **35**, 339-345, doi:10.1111/j.1439-0329.2005.00417.x (2005).
- 74 Wang, Z. *et al.* Advances in research of pathogenic mechanism of pine wilt disease. *African Journal of Microbiology Research* **4**, 437-442 (2010).
- 75 Proença, D. N. *et al.* Diversity of bacteria associated with *Bursaphelenchus xylophilus* and other nematodes isolated from *Pinus pinaster* trees with pine wilt disease. *PLoS ONE* **5**, e15191 (2010).
- 76 Roriz, M., Santos, C. & Vasconcelos, M. W. Population dynamics of bacteria associated with different strains of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* after inoculation in maritime pine (*Pinus pinaster*). *Experimental Parasitology* **128**, 357-364, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2011.04.008 (2011).
- 77 Oku, H., Shiraishi, T. & Kurozumi, S. Participation of toxin in wilting of Japanese pines caused by a nematode. *Naturwissenschaften* **66**, 210-210, doi:10.1007/bf00366031 (1979).
- 78 Kawazu, K., Zhang, H. & Kanzaki, H. Accumulation of benzoic acid in suspension cultured cells of *Pinus thunbergii* Parl. in response to phenylacetic acid administration. *Biosci Biotechnol Biochem* **60**, 1410-1412 (1996).
- 79 Guo, Q., Guo, D., Zhao, B., Xu, J. & Li, R. Two Cyclic Dipeptides from *Pseudomonas fluorescens* GcM5-1A Carried by the Pine Wood Nematode and Their Toxicities to Japanese Black Pine Suspension Cells and Seedlings in vitro. *Journal of nematology* **39**, 243-247 (2007).
- 80 Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* **10**, 57-63, doi:citeulike-article-id:3614773
doi: 10.1038/nrg2484 (2009).
- 81 Mutz, K.-O., Heilkenbrinker, A., Lönne, M., Walter, J.-G. & Stahl, F. Transcriptome analysis using next-generation sequencing. *Current Opinion in Biotechnology* **24**, 22-30, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2012.09.004 (2013).
- 82 Kikuchi, T., Jones, J. T., Aikawa, T., Kosaka, H. & Ogura, N. A family of glycosyl hydrolase family 45 cellulases from the pine wood nematode

- Bursaphelenchus xylophilus*. *FEBS letters* **572**, 201-205, doi:10.1016/j.febslet.2004.07.039 (2004).
- 83 Zhang, Q., Bai, G., Yang, W., Li, H. & Xiong, H. Pathogenic cellulase assay of pine wilt disease and immunological localization. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**, 2727-2732 (2006).
- 84 Jones, J. T., Moens, M., Mota, M., Li, H. & Kikuchi, T. *Bursaphelenchus xylophilus*: opportunities in comparative genomics and molecular host-parasite interactions. *Molecular plant pathology* **9**, 357-368, doi:10.1111/j.1364-3703.2007.00461.x (2008).
- 85 Kikuchi, T., Shibuya, H. & Jones, J. T. Molecular and biochemical characterization of an endo-beta-1,3-glucanase from the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* acquired by horizontal gene transfer from bacteria. *The Biochemical journal* **389**, 117-125, doi:10.1042/BJ20042042 (2005).
- 86 Kikuchi, T. *et al.* Expressed sequence tag (EST) analysis of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* and *Bursaphelenchus mucronatus*. *Mol Biochem Parasitol* **155**, 9-17, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.05.002 (2007).
- 87 Haegeman, A., Joseph, S. & Gheysen, G. Analysis of the transcriptome of the root lesion nematode *Pratylenchus coffeae* generated by 454 sequencing technology. *Mol Biochem Parasitol* **178**, 7-14, doi:10.1016/j.molbiopara.2011.04.001 (2011).
- 88 Haegeman, A., Mantelin, S., Jones, J. T. & Gheysen, G. Functional roles of effectors of plant-parasitic nematodes. *Gene* **492**, 19-31, doi:10.1016/j.gene.2011.10.040 (2012).
- 89 Kikuchi, T., Shibuya, H., Aikawa, T. & Jones, J. T. Cloning and characterization of pectate lyases expressed in the esophageal gland of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **19**, 280-287, doi:10.1094/MPMI-19-0280 (2006).
- 90 Kikuchi, T. *et al.* Identification of putative expansin-like genes from the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, and evolution of the expansin gene family within the Nematoda. *Nematology* **11**, 355-364, doi:10.1163/156854109x446953 (2009).
- 91 Kang, J. S. *et al.* Construction and characterization of subtractive stage-specific expressed sequence tag (EST) libraries of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Genomics* **94**, 70-77, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2009.03.001 (2009).
- 92 Lin, S., Jian, H., Zhao, H., Yang, D. & Liu, Q. Cloning and characterization of a venom allergen-like protein gene cluster from the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Experimental parasitology* **127**, 440-447, doi:10.1016/j.exppara.2010.10.013 (2011).
- 93 Kang, J. S., Koh, Y. H., Moon, Y. S. & Lee, S. H. Molecular properties of a venom allergen-like protein suggest a parasitic function in the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *International journal for parasitology* **42**, 63-70, doi:10.1016/j.ijpara.2011.10.006 (2012).
- 94 Jaubert, S. *et al.* In planta secretion of a calreticulin by migratory and sedentary stages of root-knot nematode. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **18**, 1277-1284, doi:10.1094/MPMI-18-1277 (2005).
- 95 Li, X., Zhuo, K., Luo, M., Sun, L. & Liao, J. Molecular cloning and characterization of a calreticulin cDNA from the pinewood nematode

- Bursaphelenchus xylophilus*. *Experimental Parasitology* **128**, 121-126, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2011.02.017 (2011).
- 96 Baker, C. J. & Orlandi, E. W. Active Oxygen in Plant Pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* **33**, 299-321, doi:doi:10.1146/annurev.py.33.090195.001503 (1995).
- 97 Li, Z. *et al.* Cloning and characterization of a 2-cys peroxiredoxin in the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, a putative genetic factor facilitating the infestation. *International journal of biological sciences* **7**, 823-836 (2011).
- 98 Kang, J. S. *et al.* Three acetylcholinesterases of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*: Insights into distinct physiological functions. *Mol Biochem Parasitol* **175**, 154-161, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.11.005 (2011).
- 99 Selkirk, M. E., Lazari, O. & Matthews, J. B. Functional genomics of nematode acetylcholinesterases. *Parasitology* **131 Suppl**, S3-18 (2005).
- 100 Kang, J. S., Lee, D. W., Koh, Y. H. & Lee, S. H. A soluble acetylcholinesterase provides chemical defense against xenobiotics in the pinewood nematode. *PLoS ONE* **6**, e19063, doi:10.1371/journal.pone.0019063 (2011).
- 101 Bonetta, L. Whole-genome sequencing breaks the cost barrier. *Cell* **141**, 917-919, doi:10.1016/j.cell.2010.05.034 (2010).
- 102 Lander, E. S. *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921, doi:10.1038/35057062 (2001).
- 103 Kahvejian, A., Quackenbush, J. & Thompson, J. F. What would you do if you could sequence everything? *Nature Biotechnology* **26**, 1125-1133, doi:10.1038/nbt1494 (2008).
- 104 Maxam, A. M. & Gilbert, W. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**, 560-564 (1977).
- 105 Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**, 5463-5467 (1977).
- 106 Mardis, E. R. Next-generation DNA sequencing methods. *Annual review of genomics and human genetics* **9**, 387-402 (2008).
- 107 Vera, J. C. *et al.* Rapid transcriptome characterization for a nonmodel organism using 454 pyrosequencing. *Molecular Ecology* **17**, 1636-1647, doi:10.1111/j.1365-294X.2008.03666.x (2008).
- 108 Müller, B. & Grossniklaus, U. Model organisms — A historical perspective. *Journal of Proteomics* **73**, 2054-2063, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2010.08.002 (2010).
- 109 Fukuda, K., Hogetsu, T. & Suzuki, K. Cavitation and cytological changes in xylem of pine seedlings inoculated with virulent and avirulent isolates of *Bursaphelenchus xylophilus* and *Bursaphelenchus mucronatus*. *J Jpn For Soc* **74**, 289-299 (1992).
- 110 Cheng, X. *et al.* Molecular Characterization and Functions of Fatty Acid and Retinoid Binding Protein Gene (*Ab-far-1*) in *Aphelenchoides besseyi*. *PLoS ONE* **8**, e66011, doi:10.1371/journal.pone.0066011 (2013).
- 111 Kikuchi, T., Shibuya, H., Aikawa, T. & Jones, J. T. Cloning and characterization of pectate lyases expressed in the esophageal gland of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **19**, 280-287 (2006).

- 112 Akbulut, S., Yuksel, B., Serin, M., Baysal, I. & Erdem, M. Pathogenicity of *Bursaphelenchus mucronatus* in Pine seedlings under greenhouse conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* **31**, 169 (2007).
- 113 Whitehead, A. & Hemming, J. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. *Annals of applied Biology* **55**, 25-38 (1965).
- 114 Myers, R. F. Pathogenesis in pine wilt caused by pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Journal of nematology* **20**, 236 (1988).
- 115 Evrogen. *Mint-2 cDNA synthesis kit - User Manual*. (Evrogen JSC, 2012).
- 116 Altschul, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389-3402, doi:10.1093/nar/25.17.3389 (1997).
- 117 Gouzy, J., Carrere, S. & Schiex, T. FrameDP: sensitive peptide detection on noisy matured sequences. *Bioinformatics (Oxford, England)* **25**, 670-671 (2009).
- 118 Iseli, C., Jongeneel, C. V. & Bucher, P. ESTScan: a program for detecting, evaluating, and reconstructing potential coding regions in EST sequences. *Proceedings / ... International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology ; ISMB. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, 138-148 (1999).
- 119 Quevillon, E. *et al.* InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Research* **33**, W116-120 (2005).
- 120 Hunter, S. *et al.* InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database. *Nucleic Acids Research* **40**, D306-312 (2012).
- 121 Ashburner, M. *et al.* Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics* **25**, 25-29 (2000).
- 122 Langmead, B., Hansen, K. D. & Leek, J. T. Cloud-scale RNA-sequencing differential expression analysis with Myrna. *Genome biology* **11**, R83 (2010).
- 123 Moriya, Y., Itoh, M., Okuda, S., Yoshizawa, A. C. & Kanehisa, M. KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Research* **35**, W182-185 (2007).
- 124 Rawlings, N. D., Waller, M., Barrett, A. J. & Bateman, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research* (2013).
- 125 Park, B. H., Karpinets, T. V., Syed, M. H., Leuze, M. R. & Uberbacher, E. C. CAZymes Analysis Toolkit (CAT): web service for searching and analyzing carbohydrate-active enzymes in a newly sequenced organism using CAZY database. *Glycobiology* **20**, 1574-1584 (2010).
- 126 Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Meth* **8**, 785-786, doi:http://www.nature.com/nmeth/journal/v8/n10/abs/nmeth.1701.html#supplementary-information (2011).
- 127 Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E. L. L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology* **305**, 567-580, doi:http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315 (2001).
- 128 Yook, K. *et al.* WormBase 2012: more genomes, more data, new website. *Nucleic Acids Research* **40**, D735-D741, doi:10.1093/nar/gkr954 (2012).
- 129 Wong, M. L. & Medrano, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* **39**, 75-85 (2005).

- 130 Park, J. H. *et al.* Degradome sequencing reveals an endogenous microRNA target in *C. elegans*. *FEBS letters* **587**, 964-969 (2013).
- 131 Hoogewijs, D., Houthoofd, K., Matthijssens, F., Vandesompele, J. & Vanfleteren, J. R. Selection and validation of a set of reliable reference genes for quantitative sod gene expression analysis in *C. elegans*. *BMC molecular biology* **9**, 9 (2008).
- 132 Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. & Dempfle, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* **30**, e36 (2002).
- 133 Tai, M. & Stephanopoulos, G. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metabolic engineering* **15**, 1-9 (2013).
- 134 Beekman, L., Tohver, T. & Léguillette, R. Comparison of Cytokine mRNA Expression in the Bronchoalveolar Lavage Fluid of Horses with Inflammatory Airway Disease and Bronchoalveolar Lavage Mastocytosis or Neutrophilia Using REST Software Analysis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **26**, 153-161 (2012).
- 135 Qiu, X., Wu, X., Huang, L., Tian, M. & Ye, J. Specifically Expressed Genes of the Nematode *Bursaphelenchus Xylophilus* Involved with Early Interactions with *Pine* Trees. *PLoS ONE* **8**, e78063, doi:10.1371/journal.pone.0078063 (2013).
- 136 Waetzig, G., Sobczak, M. & Grundler, F. Localization of hydrogen peroxide during the defence response of *Arabidopsis thaliana* against the plant-parasitic nematode *Heterodera glycines*. *Nematology* **1**, 681-686, doi:doi:10.1163/156854199508702 (1999).
- 137 Haegeman, A., Joseph, S. & Gheysen, G. Analysis of the transcriptome of the root lesion nematode *Pratylenchus coffeae* generated by 454 sequencing technology. *Mol Biochem Parasitol* **178**, 7-14, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.04.001 (2011).
- 138 Kang, K. A. *et al.* Antioxidant effect of homogentisic acid on hydrogen peroxide induced oxidative stress in human lung fibroblast cells. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **10**, 556-563 (2005).
- 139 Rosa, A. *et al.* Antioxidant profile of strawberry tree honey and its marker homogentisic acid in several models of oxidative stress. *Food Chemistry* **129**, 1045-1053, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.072 (2011).
- 140 Lindblom, T. H. & Dodd, A. K. Xenobiotic detoxification in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology* **305A**, 720-730, doi:10.1002/jez.a.324 (2006).
- 141 Wang, R. *et al.* Characters of homogentisate oxygenase gene mutation and high clonality of the natural pigment-producing *Vibrio cholerae* strains. *BMC microbiology* **11**, 109 (2011).
- 142 Murray, J., Manoury, B., Balic, A., Watts, C. & Maizels, R. M. Bm-CPI-2, a cystatin from *Brugia malayi* nematode parasites, differs from *Caenorhabditis elegans* cystatins in a specific site mediating inhibition of the antigen-processing enzyme AEP. *Mol Biochem Parasitol* **139**, 197-203, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2004.11.008 (2005).
- 143 Bellafiore, S. *et al.* Direct Identification of the *Meloidogyne incognita* Secretome Reveals Proteins with Host Cell Reprogramming Potential. *PLoS Pathog* **4**, e1000192, doi:10.1371/journal.ppat.1000192 (2008).

- 144 Wang, J. *et al.* Identification of potential host plant mimics of CLAVATA3/ESR (CLE)-like peptides from the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii*. *Molecular plant pathology* **12**, 177-186, doi:10.1111/j.1364-3703.2010.00660.x (2011).
- 145 Lamb, C. & Dixon, R. A. THE OXIDATIVE BURST IN PLANT DISEASE RESISTANCE. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**, 251-275, doi:10.1146/annurev.arplant.48.1.251 (1997).
- 146 Waetzig, G. H., Sobczak, M. & Grundler, F. M. Localization of hydrogen peroxide during the defence response of *Arabidopsis thaliana* against the plant-parasitic nematode *Heterodera glycines*. *Nematology* **1**, 681-686 (1999).
- 147 Robertson, L. *et al.* Cloning, expression and functional characterisation of a peroxiredoxin from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol Biochem Parasitol* **111**, 41-49, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851(00)00295-4 (2000).
- 148 Bagnall, N. H. & Kotze, A. C. cDNA cloning and expression patterns of a peroxiredoxin, a catalase and a glutathione peroxidase from *Haemonchus contortus*. *Parasitol Res* **94**, 283-289, doi:10.1007/s00436-004-1204-7 (2004).
- 149 Cookson, E., Blaxter, M. L. & Selkirk, M. E. Identification of the major soluble cuticular glycoprotein of lymphatic filarial nematode parasites (gp29) as a secretory homolog of glutathione peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**, 5837-5841 (1992).
- 150 Henkle-Dührsen, K. & Kampkötter, A. Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes. *Mol Biochem Parasitol* **114**, 129-142, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00252-3 (2001).
- 151 Herbette, S., Roeckel-Drevet, P. & Drevet, J. R. Seleno-independent glutathione peroxidases. *FEBS Journal* **274**, 2163-2180, doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05774.x (2007).
- 152 Tripp, C. *et al.* *Dirofilaria immitis*: Molecular Cloning and Expression of a cDNA Encoding a Selenium-Independent Secreted Glutathione Peroxidase. *Experimental Parasitology* **88**, 43-50, doi:http://dx.doi.org/10.1006/expr.1998.4217 (1998).
- 153 Tang, L., Gounaris, K., Griffiths, C. & Selkirk, M. E. Heterologous Expression and Enzymatic Properties of a Selenium-independent Glutathione Peroxidase from the Parasitic Nematode *Brugia pahangi*. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 18313-18318, doi:10.1074/jbc.270.31.18313 (1995).
- 154 Tang, L., Smith, V. P., Gounaris, K. & Selkirk, M. E. *Brugia pahangi*: The Cuticular Glutathione Peroxidase (gp29) Protects Heterologous Membranes from Lipid Peroxidation. *Experimental Parasitology* **82**, 329-332, doi:http://dx.doi.org/10.1006/expr.1996.0041 (1996).
- 155 Farmer, E. Fatty acid signalling in plants and their associated microorganisms. *Plant Mol Biol* **26**, 1423-1437, doi:10.1007/bf00016483 (1994).
- 156 Noordermeer, M. A., Veldink, G. A. & Vliegthart, J. F. G. Fatty Acid Hydroperoxide Lyase: A Plant Cytochrome P450 Enzyme Involved in Wound Healing and Pest Resistance. *ChemBioChem* **2**, 494-504, doi:10.1002/1439-7633(20010803)2:7/8494::aid-cbic4943.0.co;2-1 (2001).
- 157 Jones, J. T., Reavy, B., Smant, G. & Prior, A. E. Glutathione peroxidases of the potato cyst nematode *Globodera Rostochiensis*. *Gene* **324**, 47-54, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2003.09.051 (2004).
- 158 Shinya, R., Morisaka, H., Takeuchi, Y., Futai, K. & Ueda, M. Making headway in understanding pine wilt disease: What do we perceive in the postgenomic era?

- Journal of Bioscience and Bioengineering* **116**, 1-8, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.01.003 (2013).
- 159 Jensen, L. T. & Culotta, V. C. Activation of CuZn Superoxide Dismutases from *Caenorhabditis elegans* Does Not Require the Copper Chaperone CCS. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 41373-41379, doi:10.1074/jbc.M509142200 (2005).
- 160 Shibata, Y., Branicky, R., Landaverde, I. O. & Hekimi, S. Redox regulation of germline and vulval development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **302**, 1779-1782 (2003).
- 161 Liang, T., Xiu, O. U., Henkle-DÜHrsen, K. & Selkirk M, E. Extracellular and cytoplasmic CuZn superoxide dismutases from *Brugia* lymphatic filarial nematode parasites. *Infection and immunity* **62**, 961-967 (1994).
- 162 Kesba, H. H. & El-Beltagi, H. S. Biochemical changes in grape rootstocks resulted from humic acid treatments in relation to nematode infection. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **2**, 287-293, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60024-0 (2012).
- 163 Petriv, O. I. & Rachubinski, R. A. Lack of Peroxisomal Catalase Causes a Progeric Phenotype in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 19996-20001, doi:10.1074/jbc.M400207200 (2004).
- 164 Larsen, P. L. Aging and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 8905-8909 (1993).
- 165 Novelli, G. & D'Apice, M. Protein farnesylation and disease. *J Inherit Metab Dis* **35**, 917-926, doi:10.1007/s10545-011-9445-y (2012).
- 166 Wright, L. P. & Philips, M. R. Thematic review series: Lipid Posttranslational Modifications CAAAX modification and membrane targeting of Ras. *Journal of Lipid Research* **47**, 883-891, doi:10.1194/jlr.R600004-JLR200 (2006).
- 167 Freije, J. M. P. *et al.* Identification and Chromosomal Location of Two Human Genes Encoding Enzymes Potentially Involved in Proteolytic Maturation of Farnesylated Proteins. *Genomics* **58**, 270-280, doi:http://dx.doi.org/10.1006/geno.1999.5834 (1999).
- 168 Zverina, E. A., Lamphear, C. L., Wright, E. N. & Fierke, C. A. Recent advances in protein prenyltransferases: substrate identification, regulation, and disease interventions. *Current opinion in chemical biology* **16**, 544-552, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.10.015 (2012).
- 169 Al-Quadani, T., Price, C. T., London, N., Schueler-Furman, O. & AbuKwaik, Y. Anchoring of bacterial effectors to host membranes through host-mediated lipidation by prenylation: a common paradigm. *Trends in Microbiology* **19**, 573-579, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2011.08.003 (2011).
- 170 Cadiñanos, J. *et al.* Identification, functional expression and enzymic analysis of two distinct CaaX proteases from *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. J* **370**, 1047-1054 (2003).
- 171 Kikuchi, T., Jones, J. T., Aikawa, T., Kosaka, H. & Ogura, N. A family of glycosyl hydrolase family 45 cellulases from the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *FEBS letters* **572**, 201-205, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2004.07.039 (2004).
- 172 Peng, H. *et al.* Exploring the Host Parasitism of the Migratory Plant-Parasitic Nematode *Ditylenchus destructor* by Expressed Sequence Tags Analysis. *PLoS ONE* **8**, e69579, doi:10.1371/journal.pone.0069579 (2013).

- 173 Karim, N., Jones, J., Okada, H. & Kikuchi, T. Analysis of expressed sequence tags and identification of genes encoding cell-wall-degrading enzymes from the fungivorous nematode *Aphelenchus avenae*. *BMC genomics* **10**, 1-19, doi:10.1186/1471-2164-10-525 (2009).
- 174 Holaska, J. M., Black, B. E., Rastinejad, F. & Paschal, B. M. Ca²⁺-Dependent Nuclear Export Mediated by Calreticulin. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 6286-6297, doi:10.1128/mcb.22.17.6286-6297.2002 (2002).
- 175 Mueller, C. F. H. *et al.* Differential phosphorylation of calreticulin affects AT1 receptor mRNA stability in VSMC. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **370**, 669-674, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.04.011 (2008).
- 176 Goicoechea, S., Pallero, M. A., Eggleton, P., Michalak, M. & Murphy-Ullrich, J. E. The Anti-adhesive Activity of Thrombospondin Is Mediated by the N-terminal Domain of Cell Surface Calreticulin. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 37219-37228, doi:10.1074/jbc.M202200200 (2002).
- 177 Michalak, M., Robert Parker, J. M. & Opas, M. Ca²⁺ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium* **32**, 269-278, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0143416002001884 (2002).
- 178 Fisher, A. L., Page, K. E., Lithgow, G. J. & Nash, L. The *Caenorhabditis elegans* K10C2.4 Gene Encodes a Member of the Fumarylacetoacetate Hydrolase Family: A CAENORHABDITIS ELEGANS MODEL OF TYPE I TYROSINEMIA. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 9127-9135, doi:10.1074/jbc.M708341200 (2008).
- 179 Zhou, L. Z. H., Johnson, A. P. & Rando, T. A. NFκB and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radical Biology and Medicine* **31**, 1405-1416, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00719-5 (2001).
- 180 Mialki, R. K., Zhao, J., Wei, J., Mallampalli, D. F. & Zhao, Y. Overexpression of USP14 Protease Reduces I-κB Protein Levels and Increases Cytokine Release in Lung Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 15437-15441, doi:10.1074/jbc.C112.446682 (2013).
- 181 Peth, A., Besche, H. C. & Goldberg, A. L. Ubiquitinated Proteins Activate the Proteasome by Binding to Usp14/Ubp6, which Causes 20S Gate Opening. *Molecular Cell* **36**, 794-804, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2009.11.015 (2009).
- 182 Lee, B.-H. *et al.* Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature* **467**, 179-184, doi:http://www.nature.com/nature/journal/v467/n7312/abs/nature09299.html#supplementary-information (2010).
- 183 Wing, S. S. Control of ubiquitination in skeletal muscle wasting. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **37**, 2075-2087, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2004.11.011 (2005).
- 184 Chen, P. C. *et al.* The proteasome-associated deubiquitinating enzyme Usp14 is essential for the maintenance of synaptic ubiquitin levels and the development of neuromuscular junctions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**, 10909-10919 (2009).
- 185 Mines, M. A., Goodwin, J. S., Limbird, L. E., Cui, F.-F. & Fan, G.-H. Deubiquitination of CXCR4 by USP14 Is Critical for Both CXCL12-induced CXCR4 Degradation and Chemotaxis but Not ERK Activation. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 5742-5752, doi:10.1074/jbc.M808507200 (2009).

- 186 Crimmins, S. *et al.* Transgenic Rescue of ataxia Mice with Neuronal-Specific
Expression of Ubiquitin-Specific Protease 14. *The Journal of Neuroscience* **26**,
11423-11431, doi:10.1523/jneurosci.3600-06.2006 (2006).
- 187 Thorne, C., Eccles, R. L., Coulson, J. M., Urbé, S. & Clague, M. J. Isoform-
Specific Localization of the Deubiquitinase USP33 to the Golgi Apparatus.
Traffic **12**, 1563-1574, doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01261.x (2011).
- 188 Shenoy, S. K. *et al.* β -Arrestin-dependent signaling and trafficking of 7-
transmembrane receptors is reciprocally regulated by the deubiquitinase USP33
and the E3 ligase Mdm2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**,
6650-6655, doi:10.1073/pnas.0901083106 (2009).
- 189 Berthouze, M., Venkataramanan, V., Li, Y. & Shenoy, S. K. The
deubiquitinases USP33 and USP20 coordinate beta2 adrenergic receptor
recycling and resensitization. *The EMBO journal* **28**, 1684-1696 (2009).
- 190 Santulli, G. & Iaccarino, G. Pinpointing beta adrenergic receptor in ageing
pathophysiology: victim or executioner? Evidence from crime scenes. *Immunity
& ageing : I & A* **10**, 10 (2013).
- 191 Sawin, E. R., Ranganathan, R. & Horvitz, H. R. *C. elegans* Locomotory Rate Is
Modulated by the Environment through a Dopaminergic Pathway and by
Experience through a Serotonergic Pathway. *Neuron* **26**, 619-631,
doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81199-X (2000).
- 192 LECKER, S. H. *et al.* Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a
common program of changes in gene expression. *The FASEB Journal* **18**, 39-51,
doi:10.1096/fj.03-0610com (2004).
- 193 Ribeiro, P. & Patocka, N. Neurotransmitter transporters in schistosomes:
Structure, function and prospects for drug discovery. *Parasitology International*
62, 629-638, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2013.06.003 (2013).
- 194 Rao, V. T. S., Siddiqui, S. Z., Prichard, R. K. & Forrester, S. G. A dopamine-
gated ion channel (HcGGR3*) from *Haemonchus contortus* is expressed in the
cervical papillae and is associated with macrocyclic lactone resistance. *Mol
Biochem Parasitol* **166**, 54-61,
doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.02.011 (2009).
- 195 Goodman, M. B. in *Wormbook* (The *C. elegans* Research Community,
Wormbook, 2006).
- 196 Rao, V. T. S., Forrester, S. G., Keller, K. & Prichard, R. K. Localisation of
serotonin and dopamine in *Haemonchus contortus*. *International journal for
parasitology* **41**, 249-254, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.09.002
(2011).
- 197 Martin-Tanguy, J. The occurrence and possible function of hydroxycinnamoyl
acid amides in plants. *Plant Growth Regulation* **3**, 381-300 (1985).
- 198 Kulma, A. & Szopa, J. Catecholamines are active compounds in plants. *Plant
Science* **172**, 433-440, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.10.013
(2007).
- 199 Atkinson, H. J., Babbitt, P. C. & Sajid, M. The global cysteine peptidase
landscape in parasites. *Trends in Parasitology* **25**, 573-581,
doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2009.09.006 (2009).
- 200 Tort, J., Brindley, P. J., Knox, D., Wolfe, K. H. & Dalton, J. P. in *Advances in
Parasitology* Vol. Volume 43 (eds R. Muller J.R. Baker & D. Rollinson) 161-
266 (Academic Press, 1999).
- 201 Britton, C. & Murray, L. A cathepsin L protease essential for *Caenorhabditis
elegans* embryogenesis is functionally conserved in parasitic nematodes. *Mol*

- Biochem Parasitol* **122**, 21-33, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00066-X (2002).
- 202 Neveu, C., Abad, P. & Castagnone-Sereno, P. Molecular cloning and characterization of an intestinal cathepsin L protease from the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **63**, 159-165, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2003.10.005 (2003).
- 203 Lilley, C. J., Urwin, P. E., Atkinson, H. J. & McPherson, M. J. Characterization of cDNAs encoding serine proteinases from the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. *Mol Biochem Parasitol* **89**, 195-207, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851(97)00116-3 (1997).
- 204 Rehman, A. & Jasmer, D. P. Defined characteristics of cathepsin B-like proteins from nematodes: inferred functional diversity and phylogenetic relationships. *Mol Biochem Parasitol* **102**, 297-310, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851(99)00086-9 (1999).
- 205 SKUCE, P. J. *et al.* Molecular cloning and characterization of gut-derived cysteine proteinases associated with a host protective extract from *Haemonchus contortus*. *Parasitology* **119**, 405-412, doi:doi:null (1999).
- 206 Jasmer, D. P., Roth, J. & Myler, P. J. Cathepsin B-like cysteine proteases and *Caenorhabditis elegans* homologues dominate gene products expressed in adult *Haemonchus contortus* intestine. *Mol Biochem Parasitol* **116**, 159-169, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00312-7 (2001).
- 207 Newton, S. E. & Munn, E. A. The Development of Vaccines against Gastrointestinal Nematode Parasites, Particularly *Haemonchus contortus*. *Parasitology Today* **15**, 116-122, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0169-4758(99)01399-X (1999).
- 208 van der Hoorn, R. A. L. & Jones, J. D. G. The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 400-407, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2004.04.003 (2004).
- 209 Stepek, G., Lowe, A. E., Buttle, D. J., Duce, I. R. & Behnke, J. M. In vitro and in vivo anthelmintic efficacy of plant cysteine proteinases against the rodent gastrointestinal nematode, *Trichuris muris*. *Parasitology* **132**, 681-689 (2006).
- 210 Bolt, H. Experimental toxicology of formaldehyde. *Journal of cancer research and clinical oncology* **113**, 305-309 (1987).
- 211 Gonzalez, C. F. *et al.* Molecular basis of formaldehyde detoxification characterization of two S-formylglutathione hydrolases from *Escherichia coli*, Frmb and Yeig. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 14514-14522 (2006).
- 212 Kordic, S., Cummins, I. & Edwards, R. Cloning and Characterization of an S-Formylglutathione Hydrolase from *Arabidopsis thaliana*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **399**, 232-238, doi:http://dx.doi.org/10.1006/abbi.2002.2772 (2002).
- 213 Haslam, R., Rust, S., Pallett, K., Cole, D. & Coleman, J. Cloning and characterisation of S-formylglutathione hydrolase from *Arabidopsis thaliana*: a pathway for formaldehyde detoxification. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 281-288, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01378-5 (2002).
- 214 Hanson, A. D., Gage, D. A. & Shachar-Hill, Y. Plant one-carbon metabolism and its engineering. *Trends in Plant Science* **5**, 206-213, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01599-5 (2000).
- 215 Mano, J. i. Reactive carbonyl species: Their production from lipid peroxides, action in environmental stress, and the detoxification mechanism. *Plant*

- Physiology and Biochemistry* **59**, 90-97,
doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.03.010 (2012).
- 216 Moerman, D. & Baillie, D. Formaldehyde mutagenesis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **80**, 273-279 (1981).
- 217 Schirmer, E. C., Glover, J. R., Singer, M. A. & Lindquist, S. HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends in Biochemical Sciences* **21**, 289-296, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004(96)10038-4 (1996).
- 218 Flynn, J. M., Neher, S. B., Kim, Y.-I., Sauer, R. T. & Baker, T. A. Proteomic Discovery of Cellular Substrates of the ClpXP Protease Reveals Five Classes of ClpX-Recognition Signals. *Molecular Cell* **11**, 671-683, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00060-1 (2003).
- 219 Lowth, B. R. *et al.* Substrate recognition and processing by a Walker B mutant of the human mitochondrial AAA+ protein CLPX. *Journal of Structural Biology* **179**, 193-201, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2012.06.001 (2012).
- 220 Kirstein-Miles, J. & Morimoto, R. I. *Caenorhabditis elegans* as a model system to study intercompartmental proteostasis: Interrelation of mitochondrial function, longevity, and neurodegenerative diseases. *Developmental Dynamics* **239**, 1529-1538, doi:10.1002/dvdy.22292 (2010).
- 221 Wojtyra, U. A., Thibault, G., Tuite, A. & Houry, W. A. The N-terminal Zinc Binding Domain of ClpX Is a Dimerization Domain That Modulates the Chaperone Function. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 48981-48990, doi:10.1074/jbc.M307825200 (2003).
- 222 Truscott, K. N., Bezawork-Geleta, A. & Dougan, D. A. Unfolded protein responses in bacteria and mitochondria: a central role for the ClpXP machine. *IUBMB life* **63**, 955-963 (2011).
- 223 Hwan Kim, S., Ok Hong, K., Chung, W.-Y., Kwan Hwang, J. & Park, K.-K. Abrogation of cisplatin-induced hepatotoxicity in mice by xanthorrhizol is related to its effect on the regulation of gene transcription. *Toxicology and Applied Pharmacology* **196**, 346-355, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2004.01.002 (2004).
- 224 Zamani, K., Lohrasebi, T., Sabet, M. S., Malboobi, M. A. & Mousavi, A. Expression pattern and subcellular localization of *Arabidopsis* purple acid phosphatase AtPAP9. *Gene Expression Patterns*, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.gep.2013.08.001 (2013).
- 225 Schenk, G. *et al.* Identification of mammalian-like purple acid phosphatases in a wide range of plants. *Gene* **250**, 117-125 (2000).
- 226 Schenk, G., Mitić, N., Hanson, G. R. & Comba, P. Purple acid phosphatase: A journey into the function and mechanism of a colorful enzyme. *Coordination Chemistry Reviews* **257**, 473-482, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2012.03.020 (2013).
- 227 Halleen, J. M. *et al.* Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *The Journal of biological chemistry* **274**, 22907-22910 (1999).
- 228 Cortini, M. & Sitia, R. From antibodies to adiponectin: role of ERp44 in sizing and timing protein secretion. *Diabetes, Obesity and Metabolism* **12**, 39-47 (2010).
- 229 Anelli, T. *et al.* ERp44, a novel endoplasmic reticulum folding assistant of the thioredoxin family. *The EMBO journal* **21**, 835-844 (2002).

- 230 Anelli, T. *et al.* Thiol-mediated protein retention in the endoplasmic reticulum: the role of ERp44. *The EMBO journal* **22**, 5015-5022 (2003).
- 231 Benham, A. M., van Lith, M., Sitia, R. & Braakman, I. Ero1-PDI interactions, the response to redox flux and the implications for disulfide bond formation in the mammalian endoplasmic reticulum. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **368**, doi:10.1098/rstb.2011.0403 (2013).
- 232 Gidalevitz, T., Stevens, F. & Argon, Y. Orchestration of secretory protein folding by ER chaperones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* (2013).
- 233 Ramya, K., Ayyappa, K. A., Ghosh, S., Mohan, V. & Radha, V. Genetic association of ADIPOQ gene variants with type 2 diabetes, obesity and serum adiponectin levels in south Indian population. *Gene* **532**, 253-262, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2013.09.012 (2013).
- 234 Svensson, E. *et al.* The adiponectin receptor homologs in *C. elegans* promote energy utilization and homeostasis. *PloS one* **6**, e21343 (2011).
- 235 Freyaldenhoven, S. *et al.* The role of ERp44 in maturation of serotonin transporter protein. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 17801-17811 (2012).
- 236 Tree, T. I. M. *et al.* Characterisation of an immunodominant glycoprotein antigen of *Onchocerca volvulus* with homologues in other filarial nematodes and *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biochem Parasitol* **69**, 185-195, doi:http://dx.doi.org/10.1016/0166-6851(94)00204-Z (1995).
- 237 Prior, A. *et al.* A surface-associated retinol- and fatty acid-binding protein (Gp-FAR-1) from the potato cyst nematode *Globodera pallida*: lipid binding activities, structural analysis and expression pattern. *The Biochemical journal* **356**, 387-394 (2001).
- 238 Basavaraju, S. *et al.* Ac-FAR-1, a 20 kDa fatty acid- and retinol-binding protein secreted by adult *Ancylostoma caninum* hookworms: gene transcription pattern, ligand binding properties and structural characterisation. *Mol Biochem Parasitol* **126**, 63-71, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00253-0 (2003).
- 239 Cheng, X. *et al.* Molecular Characterization and Functions of Fatty Acid and Retinoid Binding Protein Gene in *Aphelenchoides besseyi*. *PLoS ONE* **8**, e66011, doi:10.1371/journal.pone.0066011 (2013).
- 240 Garofalo, A. *et al.* The FAR Protein Family of the Nematode *Caenorhabditis elegans* : DIFFERENTIAL LIPID BINDING PROPERTIES, STRUCTURAL CHARACTERISTICS, AND DEVELOPMENTAL REGULATION. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 8065-8074, doi:10.1074/jbc.M206278200 (2003).
- 241 Fairfax, K. C. *et al.* Characterisation of a fatty acid and retinol binding protein orthologue from the hookworm *Ancylostoma ceylanicum*. *International journal for parasitology* **39**, 1561-1571 (2009).
- 242 Prior, A. *et al.* A surface-associated retinol- and fatty acid-binding protein (Gp-FAR-1) from the potato cyst nematode *Globodera pallida*: lipid binding activities, structural analysis and expression pattern. *Biochem. J.* **356**, 387-394 (2001).
- 243 Urwin, P. E., Lilley, C. J. & Atkinson, H. J. Ingestion of double-stranded RNA by preparasitic juvenile cyst nematodes leads to RNA interference. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **15**, 747-752 (2002).
- 244 Pellerone, F. I. *et al.* Trehalose metabolism genes in *Caenorhabditis elegans* and filarial nematodes. *International journal for parasitology* **33**, 1195-1206 (2003).
- 245 Somerville, A. C. *Trehalose catabolism in the nematode Caenorhabditis elegans* Doctor thesis, Australian National University, (1999).

- 246 Solomon, A., Salomon, R., Paperna, I. & Glazer, I. Desiccation stress of
entomopathogenic nematodes induces the accumulation of a novel heat-stable
protein. *Parasitology* **121**, 409-416 (2000).
- 247 Singer, M. A. & Lindquist, S. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*:
the Yin and Yang of trehalose. *Trends in Biotechnology* **16**, 460-468 (1998).
- 248 Perry, R. Dormancy and hatching of nematode eggs. *Parasitology Today* **5**, 377-
383 (1989).
- 249 Dmitryjuk, M. & Zóltowska, K. Purification and characterization of acid
trehalase from muscle of *Ascaris suum* (Nematoda). *Comparative biochemistry
and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* **136**, 61-69 (2003).
- 250 Atkinson, H. J., Urwin, P. E. & McPherson, M. J. Engineering plants for
nematode resistance. *Annual Review of Phytopathology* **41**, 615-639 (2003).
- 251 Xue, Y., Liu, Z., Cao, J. & Ren, J. Computational Prediction of Post-
Translational Modification Sites in Proteins. *Systems and Computational
Biology – Molecular and Cellular Experimental Systems* (2011).
- 252 Mochida, K. *et al.* In silico analysis of transcription factor repertoire and
prediction of stress responsive transcription factors in soybean. *DNA research :
an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*
16, 353-369 (2009).

Material suplementar

1. Avaliação do nível de similaridade cut-off

O nível de similaridade definido como parâmetro na comparação estrutural segundo o CD-HIT deve ser definido consoante o objetivo da comparação e as características dos transcritomas envolvidos. Caso se pretenda utilizar um filtro largo na eliminação da redundância e agrupar as sequências em grandes grupos pode-se usar um nível de similaridade baixo, mas se o objetivo for o restrito agrupamento de sequências que codifiquem exatamente a mesma proteína (com a mesma função catalítica, localização organelar, etc) o nível de similaridade terá de ser perto de 100%.

A redundância dos transcritomas foi avaliada utilizando vários níveis de similaridade, sendo os resultados apresentados na Tabela Suplementar 1. Na literatura os níveis de 40%²⁵¹, 60%²⁵² e 80%²¹ são descritos como adequados para a eliminação de redundância e, conseqüentemente, promovendo análises posteriores mais efetivas, como a anotação funcional. Grande parte dos efetores de *B. xylophilus* que interagem com a planta hospedeira não são conhecidos logo o nosso objetivo consistiu na eliminação de redundância sem perder informação sobre proteínas cujas sequências são similares mas que podem apresentar diferentes funções.

Tabela Suplementar 1 - Avaliação do nível de similaridade adequado à análise CD-Hit. Foram selecionadas 6.392 sequências aleatoriamente e submetidas à ferramenta cd-hit para o agrupamento segundo diferentes níveis de similaridade como limite mínimo. Os resultados foram comparados e testes foram realizados para confirmar a validade dos resultados obtidos para os diferentes níveis de similaridade.

Nível de similaridade	# Clusters	Redundância eliminada
95 %	6.392	0 %
80 %	6.108	4 %
60 %	5.839	9%
40 %	5.451	15%
30 %	4.977	22%

Foram efetuados alinhamentos suplementares de sequências e comparadas as respectivas anotações (obtidas no pipeline de processamento das *reads*) para avaliar, manualmente, se proteínas agrupadas no mesmo *cluster* podiam representar diferentes funções. O nível de similaridade 60% apresentou alguns alinhamentos com pouca confiança, enquanto com 80% de similaridade mínima, as sequências alinhadas muito

provavelmente codificam a mesma proteína. A redução da redundância utilizando 60 e 80% não é acentuada, em que 96% das sequências que partilham menos de 80% de similaridade, também apresentam uma similaridade inferior a 60%. Assim, a maior confiança nos resultados gerados utilizando o nível de similaridade 80% determinou a escolha do limite mínimo de similaridade a utilizar na análise pelo CD-Hit.

2. Anotação InterPro das sequências específicas de *B. xylophilus* identificadas na abordagem de transcritômica integrada com Myrna

Tabela Suplementar 2 - Identificação de grupos de anotação funcional de interesse com base na anotação InterPro das sequências específicas de *B. xylophilus* identificadas na abordagem de transcritômica integrada com Myrna. A abordagem utilizada incluiu a análise dos termos InterPro (GPCR: recetor acoplado à proteína G; TM: domínio transmembranar; ACP: proteína transportadora de grupos acilo; BadF/BadG/BcrA/BcrD: subunidade da Benzoil-CoA redutase; PNT: piridina nucleótido transhidrogenase; FRM1: *FraX Mental Retardation 1*; ERG: *EST* (fator de transcrição da transformação específica de eritróblastos) *related gene*) e da anotação da sequência por BLAST. As informações das funções (CoA: coenzima A; ROS: espécies reativas de oxigénio) descritas foram obtidas a partir descrição sobre cada termo InterPro disponível na base de dados.

Termos InterPro	Anotação por Blast	Função
Grupo de GPCRs		
GPCR, família 2, tipo-secretina (IPR000832)	Recetor de calcitonina	Regulação do desenvolvimento
GPCR, família 3 (IPR000337)	Recetor de glutamato metabotrópico	Neurotransmissor que modula a função sináptica
GPCR, família 3, recetor de ácido amino-butírico gama, tipo B (IPR002455)	GPCR 51	Inibição da transmissão sináptica
GPCR TM7, classe sx de recetores de serpentina (IPR019424)	Membro da família de classes sx de serpentina	Associação à quimiorreção neuronal em <i>C. elegans</i>
GPCR TM7, classe g de recetores de serpentina (IPR000609)	-	Associação à quimiorreção neuronal em <i>C. elegans</i>
GPCR TM7, classe r de recetores de serpentina, <i>Nematode</i> (IPR019428)	-	Associação à quimiorreção neuronal em <i>C. elegans</i>

Tabela Suplementar 2 - Identificação de grupos de anotação funcional de interesse com base na anotação InterPro das sequências específicas de *B. xylophilus* identificadas na abordagem de transcritômica integrada com Myrna. A abordagem utilizada incluiu a análise dos termos InterPro (GPCR: recetor acoplado à proteína G; TM: domínio transmembranar; ACP: proteína transportadora de grupos acilo; BadF/BadG/BcrA/BcrD: subunidade da Benzoil-CoA redutase; PNT: piridina nucleótido transhidrogenase; FRM1: *FraX Mental Retardation 1*; ERG: *EST* (fator de transcrição da transformação específica de eritróblastos) *related gene*) e da anotação da sequência por BLAST. As informações das funções (CoA: coenzima A; ROS: espécies reativas de oxigénio) descritas foram obtidas a partir descrição sobre cada termo InterPro disponível na base de dados. (Continuação)

Termos InterPro	Anotação por Blast	Função
Metabolismo de ácidos gordos		
Recetor do neuropéptido Y (IPR000611)	Putativo recetor 11 do neuropéptido Y	Aumento da ingestão de alimento e armazenamento de energia em lípidos (metabolismo de ácidos gordos)
ACN9 (IPR008011)	Homólogo mitocondrial da proteína ACN9	Metabolismo da acetil-CoA
ATPase, tipo BadF/BadG/BcrA/BcrD (IPR002731)	N-Acetilglicosamina cinase	Metabolismo da acetil-CoA (Benzoil-CoA redutase)
ATP-citrato liase/succinil-CoA ligase, sítio ativo (IPR017440)	Succinil-CoA sintetase, subunidade α	Metabolismo da acetil-CoA (produção)
β -cetoacil sintase, C-terminal (IPR014031)	Ácido gordo sintase	Síntese de ácidos gordos
β -cetoacil sintase, N-terminal (IPR014030)	Ácido gordo sintase	Síntese de ácidos gordos
Biotina carboxilase, C-terminal (IPR005482)	Acetil-CoA carboxilase 1	Síntese de ácidos gordos
Malonil-CoA ACP transacilase, ACP-ligação (IPR016036)	Proteína transacilase transportadora de Malonil-CoA	Síntese de ácidos gordos (através do metabolismo da CoA)
Resposta a estímulos		
Alanina desidrogenase /PNT, N-terminal (IPR007886)	Piridina nucleótido transhidrogenase	Destoxificação de ROS
Citocromo b245, cadeia pesada (IPR000778)	Dual oxidase 1	Transporte de eletrões através da membrana plasmática para síntese de superóxido

Tabela Suplementar 2 - Identificação de grupos de anotação funcional de interesse com base na anotação InterPro das sequências específicas de *B. xylophilus* identificadas na abordagem de transcritômica integrada com Myrna. A abordagem utilizada incluiu a análise dos termos InterPro (GPCR: recetor acoplado à proteína G; TM: domínio transmembranar; ACP: proteína transportadora de grupos acilo; BadF/BadG/BcrA/BcrD: subunidade da Benzoil-CoA redutase; PNT: piridina nucleótido transhidrogenase; FRM1: *FraX Mental Retardation 1*; ERG: *EST* (fator de transcrição da transformação específica de eritróblastos) *related gene*) e da anotação da sequência por BLAST. As informações das funções (CoA: coenzima A; ROS: espécies reativas de oxigénio) descritas foram obtidas a partir descrição sobre cada termo InterPro disponível na base de dados. (Continuação)

Termos InterPro	Anotação por Blast	Função
Citocromo c oxidase, subunidade I (IPR000883)	Citocromo c oxidase, subunidade I	Hidroxilação e oxidação de aromáticos; presença de atividade de peroxidase
Fator de maturação da Dual oxidase (IPR018469)	Proteína C06E1.3 tipo fator de maturação da Dual oxidase	Geração de peróxido de hidrogénio
Homogentisato 1,2-dioxigenase (IPR005708)	Homogentisato 1,2-dioxigenase	Destoxificação de ROS
Sistema nervoso		
Interação com FMR1 citoplasmática (IPR008081)	Homólogo da proteína de interação com FMR1	Desenvolvimento e manutenção das estruturas neuronais
Biosíntese de ergosterol ERG4/ERG24 (IPR001171)	7-desidrocolesterol redutase	Produção de colesterol a partir de 7-desidrocolesterol e inibição da sua função prejudica gravemente o desenvolvimento cerebral
Hidroximetilglutaril-coenzima A sintase, N-terminal (IPR013528)	Hidroximetilglutaril-CoA sintase, citoplasmática	Envolvimento no metabolismo do cérebro

3. Primers utilizados na quantificação por RT-qPCR

Tabela Suplementar 3 - Primers desenhados para amplificação dos genes de interesse. A diferença entre as eficiências de amplificação do CDC-42 e o gene alvo, aquando da otimização da concentração de primer nunca foi superior a 5%. Este valor é considerado o aceitável para a correta determinação da eficiência de amplificação do gene alvo e, conseqüente, avaliação da possibilidade de este poder ser comparado com o gene endógeno¹²⁹.

Gene	Par de primers	Concentração de primer (nM)	Eficiência de amplificação (%)
Bx-CDC42	TTTCCTATAACCACCAACAAGTTTCC ATTACCGTCACCGCATAATTATCG	100	95
Bm-CDC42	CAAGTGGACTTACGGGACGATATC TTGTGATTGGTCGTTGTTTGTCT	100	96
4HPPD	GAGTGGACTCAAGATAAAGGAGGACA GCATTGGATTAAGTATCCCTTTTCG	150	96
HGD	AATGATTTCTCCAGATTCCATCCT TCTTCTGATCGGTTAATGGAAGTG	150	100
MAI	CCTGTTTTTATCCATGGAAGACAA TTTTGGTGTCATCGGATATTCTTCT	200	101
FAH	ACAACCCTAAACAAGAGCCAATC CTTGCAGCTTGATATCGAAACTGT	200	96
Bx-FCE-1	GGACAAGAGAGTAAAGCGGATCAT ACAGCGCTTATTAAGTTGGGAAAG	100	96
Bm- FCE-1	TGACAGTGAGCTCAAGACAAAGATT AACATACAGCTTGGTCAATGGAAA	150	94
Bx-GPX	AACCATCATCCCCTATATGAATTCTT TCTCTTTCCGATCTGGACAACT	100	98
Bm-GPX	CTTTCCTTGCAACCAATTCTATCTT GTGCATGATTCCATTCAAAGTTC	150	96
Bx-CAT	ATTATCATCGTCTTGGACCCAATT TGGATATTTGCACTCGAGTCTTAT	100	91
Bm-CAT	TTACAACCAGTTACCAATCAATTGC CCATCAAACCATCTCTCTGGATATT	150	95
Bx-SOD	CGTCTCTGGAGTTGTCTGGTTTAC CAATCCCTTAATCTCACCATCGA	100	96
Bm-SOD	GACCACACTTCAATCCTTTCAAGAA GACCTTATCCACGAACGAGAACTT	150	91

Tabela Suplementar 3 - Primers desenhados para amplificação dos genes de interesse. A diferença entre as eficiências de amplificação do CDC-42 e o gene alvo, aquando da otimização da concentração de primer nunca foi superior a 5%. Este valor é considerado o aceitável para a correta determinação da eficiência de amplificação do gene alvo e, conseqüente, avaliação da possibilidade de este poder ser comparado com o gene endógeno¹²⁹. (Continuação)

Gene	Par de primers	Concentração de primer (nM)	Eficiência de amplificação (%)
GHF45	CCGTGGATGACAACCTGAGTTAC GTTTCGTAGCAAGAGCAGCACC	200	100
GHF16	TACAAACTTACCTGGAACGAAACG ATGTCTGAAGACCATGAATTGGTTT	200	104
PEL	AATGGAGGCGGTACTGTTACCAT TTTCCACAAGAGCGGTACAGTTT	150	97
Vap 1	ACTACATGAACCCTGGAAATGTGAT TTGAGCAGGGTTCTCCAGTAATGT	200	104
VAP 2	CGAGTATTAGTTCTGACGGCTTTGT TGTTGTGGGCATCCAGGAT	200	107
CAL	TTACCACGGAGAGTCGGACTATG TCAAATGGTTCTTGCCCTTGAGT	200	99
Usp 33	AAATGCCAAGGATTGAGAAAGATC GTGCTGGAATGACTCAGAGATGAA	150	100
USP 14	CCAATTTAGGCAACACATGCTACA GCTTTTTCACTGCCAGAAGGTC	150	103
CAT L	TTGTTAGATTGTGACAAGAAAGACGAG TTGCCCCCTTGATGGATAGTCT	150	95
CAT B	GACAGAATCTGCATTCACAGCAA CACAACAGCTCAGCAAATCTTCA	150	95
CPI #1	TTGAATGATCCCGAAGTTTTGAG GTTTTTTAGCAGCGAGCACTTGAT	150	101
CPI 5	GGGTGGTCTAACGTTTCAGTGAAT TGCCCTTCTTGATGTGAATAGATCT	150	100
SFHy	GCCAACTCTTGCCAGAGAATCT TCTCTCTTCTGAAATCAATGGTCAA	150	96
TRE	GACTTGAACGCGTACATCTGTTG TTTCCAAATTGGTCAACCTTCTC	250	96
PAP#1	AAGATATTTTGAGGGACGGAGTTG CCGTAGTCGAAGAGAACCCTTTTCT	150	102
PAP#2	TTGGCCTACGCTTGGAAGAGTA CAGGGAACATTCTTTCTGTTTTCA	150	99
PAP#3	AGACAAGCTCAAGACAGGGAGTTC CGTCATCCATATTGTATGCCAAGT	175	97

Tabela Suplementar 3 - Primers desenhados para amplificação dos genes de interesse. A diferença entre as eficiências de amplificação do CDC-42 e o gene alvo, aquando da otimização da concentração de primer nunca foi superior a 5%. Este valor é considerado o aceitável para a correta determinação da eficiência de amplificação do gene alvo e, conseqüente, avaliação da possibilidade de este poder ser comparado com o gene endógeno¹²⁹. (Continuação)

Gene	Par de primers	Concentração de primer (nM)	Eficiência de amplificação (%)
FAR1	GCTGTACAACAAAGCCGTTGAAC GGCTTCAGTGTTGAGAGAATCGAT	175	96
ERp44	AATTCAAATTGTGTGCCCTTGAT CCAAGTGTCGGAAAAGTATTAAGA	150	102
ClpX	AACATTACAAGAGACTTGAGCACAATG GCGTCCTTGGATGTGTTCTTACTT	175	95