

**Universidade de Lisboa**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS**

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Avaliação da expressão de genes relacionados com a susceptibilidade a *Bursaphelenchus xylophilus*, agente causal da doença da murchidão dos pinheiros (pine wilt disease) em *Pinus pinaster* Ait e *Pinus yunnanensis* Franch**

**Cândida Sofia Monteiro Pinheiro Pereira Trindade**

Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia

**2012**

**Universidade de Lisboa**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS**

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Avaliação da expressão de genes relacionados com a susceptibilidade a *Bursaphelenchus xylophilus*, agente causal da doença da murchidão dos pinheiros (pine wilt disease) em *Pinus pinaster* Ait e *Pinus yunnanensis* Franch**

**Cândida Sofia Monteiro Pinheiro Pereira Trindade**

Master in Biologia Celular e Biotecnologia

Tese orientada por : Doutora Rita Costa e Doutora Ana Margarida Fortes

**2012**

**“Uma vida feliz, não consiste na ausência, mas no domínio das dificuldades”**

**Helen Keller**

## Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer à Doutora Rita Costa e à Doutora Margarida Fortes pela orientação e disponibilidade durante a realização deste trabalho.

Ao Doutor Edmundo Sousa, a aceitação e receção no laboratório.

À Doutora Teresa Valdivieso o meu muito obrigado, pela amizade, pela orientação prestada em Histologia, pela coragem, por sempre acreditar no meu trabalho.

Um especial obrigado novamente à Doutora Rita Costa e Teresa Valdivieso, pela compreensão quando mais precisei, por toda a força.

Ao Professor Pedro Fevereiro pela possibilidade de frequentar o laboratório no ITQB e por toda a ajuda prestada. E ao Doutor Jorge pela disponibilidade de primers.

À Rita Morgado, pela ajuda como o nosso amigo qPCR, por toda a disponibilidade. Obrigado.

À Carmen Santos, pela ajuda prestada em todas as tarefas que precisei. Obrigada pelo tempo que prestou e obrigada pela companhia no laboratório.

À Doutora Maria João Sousa, por acreditar no meu trabalho, pela amizade.

A todas as pessoas pertencentes à Nematologia, Lurdes Inácio, Margarida Fontes, Cidália, pela amizade, pela disponibilidade de me ensinar, por toda a ajuda, por todo o carinho, por toda a força, e especialmente por me darem na cabeça “Olha a escrita”.

À Amélia Palma pela disponibilidade e ajuda na área de Anatomia.

A todas as pessoas pertencentes ao INIAV que de alguma forma me ajudaram.

E agora um muitíssimo obrigado à Cat, Rita, Joana, Miguel, São, kamila, Luís e Beta pelas horas fantásticas na hora de almoço. Belas horas de descontração. Um especial obrigado à Beta, por ser a pessoa que é. Obrigada pela amizade. Obrigado a todos do MS que me acolheram e estiveram sempre presentes nesta etapa da minha vida.

O meu MUITÍSSIMO obrigado ao Luís, por toda a companhia, por toda a amizade, por me aturares, por todos os meus 5 min. Obrigado pelas horas perdidas à minha espera !!

Um agradecimento especial ao meu grande e fiel amigo Rafael. Sempre acreditou em mim, sempre me acompanhou, esteve SEMPRE nos bons e maus momentos ao meu lado. O meu muito obrigado.

Obrigado à Vânia, pela preocupação, pela coragem, pela amizade.

Um grande obrigado ao Porfírio, Luísa e todos os meus amigos de Ovar, pela amizade.

Ao Paulo, por nos momentos difíceis teres estado presente, pela amizade. Obrigado!!

E finalmente obrigado aos meus pais e à minha avó. Mesmo nos momentos mais difíceis, o amor é sempre incondicional

## RESUMO

A floresta constitui um bem precioso à escala mundial, do ponto de vista ecológico, paisagístico e económico. No entanto, nos últimos tempos tem-se registado um grave declínio de muitas espécies florestais, sendo em Portugal, o pinheiro bravo, *Pinus pinaster* Ait das espécies mais afetadas. Uma das principais causas, identificada nas últimas décadas, para este declínio, é o nemátode da madeira do pinheiro. O nemátode da madeira do pinheiro (NMP), *Bursaphelenchus xylophilus*, é um organismo microscópico que causa a doença da murchidão dos pinheiros “pine wilt disease”. Numa tentativa de diminuir as perdas resultantes da doença, o estudo da resistência do hospedeiro é uma das abordagens de investigação que se iniciou recentemente em Portugal, com o objetivo de melhorar a sua resistência e selecionar árvores com menor suscetibilidade à infeção. A identificação de genes, promotores e marcadores moleculares ligados à resistência à doença, que possam vir a ser mais tarde utilizadas na seleção assistida de genótipos com menor suscetibilidade ao NMP, poderá contribuir para acelerar os programas de melhoramento para a resistência a implementar para esta espécie. Nesse sentido, este trabalho teve como principal objetivo determinar os tempos mais relevantes, após inoculação com NMP, a utilizar para ulterior sequenciação em massa, de bibliotecas de cDNA de *Pinus pinaster* a a espécie Asiática *Pinus yunnanensis*, utilizada como controle de tolerância/resistência para a comparação ulterior de transcritomas destas duas espécies em resposta à infeção com NMP. Foi também comparada a distribuição e propagação do nemátode no interior das duas espécies, após inoculação com NMP, em plantas de três anos, através de observações histológicas. Para determinação dos TAI (Tempos Após Inoculação) relevantes, em termos de expressão de genes candidatos de resistência a stresses bióticos, estudou-se a expressão diferencial dos seguintes genes: Thaumatin like protein, Endo-quitinase, Pinosylvin synthase, Superoxide dismutase-like protein e Allene Oxide Cyclase, através da técnica Real-Time Polymerase Chain Reaction.

As observações histológicas permitiram observar que os canais de resina têm maior diâmetro em *Pinus pinaster* do que em *Pinus yunnanensis*, foi possível também verificar que, após inoculação, há um aumento acentuado de inclusões de amido na espécie Mediterrânica, em comparação com a espécie Asiática, em que as inclusões não sofrem alteração de número depois da inoculação com NMP. Quanto aos TAI, pode-se concluir que os primeiros tempos após a infeção, respetivamente 6h e 24h são os tempos em que há uma maior expressão diferencial dos genes em estudo e, portanto, os que se elegem para ulterior sequenciação de bibliotecas de cDNA.

Palavras-chave: “Pine wilt disease”, *Bursaphelenchus xylophilus*, *Pinus pinaster*, *Pinus yunnanensis*, genes candidatos de resistência, histopatologia.

## ABSTRACT

The forest is a valuable resource on a global scale, for ecological, economical and landscape purposes. However, recently there has been a serious decline of many forest species, being the maritime pine, *Pinus pinaster* Ait the most affected species in Portugal. A major cause detected in recent decades for this decline is the pine wood nematode. The pine wood nematode (PWN), *Bursaphelenchus xylophilus*, is a microscopic organism that causes pine wilt disease. In an attempt to reduce losses caused by this disease, the study of host resistance is one of the research approaches that recently started in Portugal, aiming to improve their resistance and select trees with lower susceptibility to infection. The identification of genes, promoters and molecular markers linked to disease resistance, that can be later used in marker assisted selection of genotypes with reduced susceptibility to NMP may help to accelerate the breeding programs for resistance to be implemented for this species. Taking this into account, this study aimed to determine the most relevant times after inoculation with NMP to be used for subsequent sequencing of cDNA libraries of *Pinus pinaster* and *Pinus yunnanensis* an Asian species, used as control of tolerance / resistance for further comparison of transcriptoms for these two species in response to the infection with PWD. The distribution and spread of nematodes was also compared within the two species after inoculation of three years' old plants with NMP, by histological observations. For the determination of relevant TAI (Time After Inoculation) gene expression of the following genes was studied: Thaumatin like protein, endochitinase, Pinosylvin synthase, Superoxide dismutase-like protein and Allene Oxyde cyclase using Real-Time Polymerase Chain Reaction. Histological observations allowed the observation that the resin ducts have a larger diameter in *Pinus pinaster*, than in *Pinus yunnanensis*. It was also possible to verify that, after inoculation, there is an increase of starch inclusions in the Mediterranean type, as compared with the Asian species, where the inclusions do not change in number after inoculation with NMP. Regarding the TAI, one can conclude that early times after infection, respectively 6h and 24h are the ones where a greater differential expression of the genes under study was observed and therefore they are chosen for subsequent sequencing of cDNA libraries.

Keywords: "Pine wilt disease", *Bursaphelenchus xylophilus*, *Pinus pinaster*, *Pinus yunnanensis*, candidate genes for resistance, histopathology

# Índice

1-Introdução .....	1
1.1-Pinheiro Bravo: Distribuição, taxonomia e importância .....	1
1.1.1- Pinheiro Bravo ( <i>Pinus pinaster</i> ) em Portugal e distribuição Mundial .....	1
1.1.2- Características gerais do Pinheiro Bravo .....	2
1.1.3 – Importância do Pinheiro Bravo .....	2
1.2 – Doença da murchidão dos pinheiros .....	3
1.2.1 – Nemátode da madeira do pinheiro .....	3
1.2.2 – Caracterização do Nemátode da Madeira, <i>B. xylophilus</i> .....	3
1.2.3 – Inseto Vetor ( <i>Monochamus galloprovincialis</i> ) .....	4
1.2.4 – Interação nemátode – Hospedeiro – Inseto vetor e Sintomatologia .....	5
1.3 – Patogenicidade do Nemátode da Madeira do Pinheiro.....	7
1.3.1- <i>Pinus yunnanensis</i> .....	7
1.4 - Melhoramento para a resistência ao nemátode na madeira de pinheiro .....	7
1.4.1- Genes candidatos à resistência ao nemátode .....	9
1.5 – Histopatologia .....	11
1.5.1 – Inclusões de amido.....	11
1.6 -Os objetivos específicos deste trabalho são os seguintes:.....	12
2- Material e Métodos .....	13
2.1 – Material Biológico .....	13
2.2 Ensaio de patogenicidade com <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> e colheita de material vegetal .....	14
2.3 – Ácidos nucleicos .....	16
2.4- Seleção de genes candidatos de resistência e desenho de primers .....	18
2.5- RT-PCR em tempo Real .....	20
3- Resultados .....	23
3.1 – Contagem e identificação de <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> .....	23
3.2 – Extração de RNA e síntese de cDNA.....	31
3.3 – Amplificação dos genes de estudo .....	32
3.4 – Determinação da Eficiência da amplificação específica .....	33
3.5 – Seleção dos genes de Referência.....	34
3.6 – Quantificação Relativa dos genes de estudo .....	36
4- Discussão .....	38
4.1 – Histopatologia .....	38
4.2 – Expressão dos genes de estudo .....	40
5 – Conclusões e perspectivas futuras .....	42
6 - Bibliografia .....	43

## Abreviaturas

A, C, G, T – bases nucleotídicas: Adenina, Citosina, Guanina, Timina

*aoc* – Allene Oxyde Cyclase

Bx – *Bursaphelenchus xylophilus*

bp – par de bases

DB – Data Base

dNTPs - desoxinucleótido trifosfato; engloba dATP, dCTP, dGTP, dTTP

EST - Expressed Sequence Tags

*end* – *Endo-quitinase*

fig. – figura

g – gramas

HR – Resposta Hipersensitiva

h – horas

min – minutos

mL- mililitros

NMP-Nemátode da Madeira do Pinheiro

*pss* – *Pinosylvin synthase*

PIB – Produto Interno Bruto

PRs– Proteínas Relacionadas com a patogénese

Pp – *Pinus pinaster*

Py – *Pinus yunnanensis*

PCR - Polymerase Chain Reation

qRT-PCR - Real-time polymerase chain reaction

*sdlp* – *Superoxide dismutase-like protein*

SAR - Resistência Sistémica Adquirida

s – segundos

SD – Standard Deviation

*tlp* – *Thaumatococcus like protein*

TBE – Tampão de eletroforese Tris- Borato- EDTA

µL – microlitros

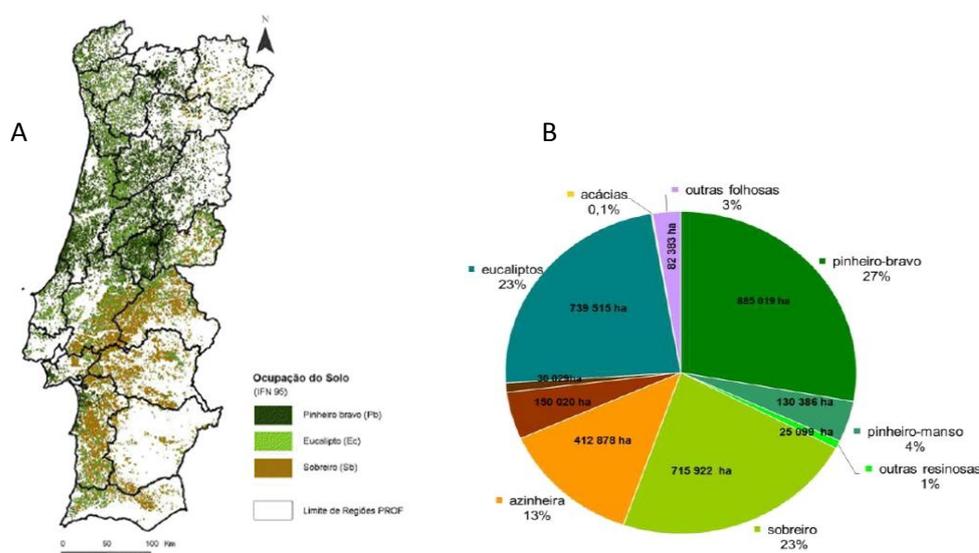
µg – microgr

# 1-Introdução

## 1.1-Pinheiro Bravo: Distribuição, taxonomia e importância

### 1.1.1- Pinheiro Bravo (*Pinus pinaster*) em Portugal e distribuição Mundial

No quadro da União Europeia, Portugal é um país que se destaca pela proporção da sua área florestal. Com perto de 8,9 milhões de hectares de território nacional, os nossos 3,45 milhões de hectares de área florestal, apurados no mais recente Inventário Florestal Nacional, correspondem a aproximadamente 38% da ocupação do solo. O sector florestal português assume-se como um dos que mais têm contribuído para a economia nacional, representando 1,65 do PIB (2008) e 12% (2010) das exportações (AIFF 2010). De entre as espécies da nossa floresta destaca-se, pelos dados do inventário florestal nacional de 2005, a ocupação de pinheiro bravo (*Pinus pinaster*) que corresponde a aproximadamente 855 000 hectares, isto é, cerca de 27% da área florestal total ocupada por povoamentos florestais (fig.1).



**Figura 1 – A:** Composição da floresta em Portugal, espécies arbóreas predominantes. (AFN, 2010); **B:** Área de ocupação (ha) do solo em Portugal, das espécies predominantes (IFN5)

A área de distribuição do Pinheiro bravo é dispersa, podendo considerar-se a existência de três sectores com distintos significados ecológicos, genéticos e até económicos. O sector Atlântico, o mais importante, compreende dois subsectores: o subsector da Aquitânia e o subsector Ibérico que se estende do noroeste de Espanha até Lisboa. (Silva, 2007). A área de distribuição em Portugal resulta fundamentalmente da ação humana, quer pela destruição das florestas naturais, quer pela arborização, correspondendo essencialmente à faixa litoral que vai desde as bacias do Tejo e Sado

até ao rio Minho estendendo-se para o interior das regiões Norte e Centro (Aguiar *et al.*, 2003).

### **1.1.2- Características gerais do Pinheiro Bravo**

O Pinheiro bravo, resinosa pertencente à família das *Pinaceae* e género *Pinus*, é uma árvore de grande porte que mede aproximadamente entre 20 a 40 metros de altura, pertence à classe das Gimnospérmicas, espécie *Pinus pinaster*, estabelecido por Aiton (1739). De floração monóica e polonização anemogâmica, apresenta flores masculinas dispostas em inflorescências douradas e flores femininas dispostas em inflorescências rosadas, sendo o seu período ótimo de floração, o início da primavera. Apresenta um ritidoma (casca) espesso de cor castanho avermelhado e profundas fissuras, as folhas são acículas (agulhas) aparelhadas e de cor verde escura, medem cerca de 10 a 20 centímetros e são robustas, rígidas e persistentes. (Aguiar, 2012).

O crescimento anual em altura de *Pinus pinaster* resulta exclusivamente da expansão de gomos ou gemas formados no ano anterior, que contêm os primórdios de todo o lançamento do ano, isto é, primórdios de agulhas, entrenós e eventualmente flores. É uma espécie de enorme plasticidade, quanto às condições climáticas em que sobrevive, mostrando uma nítida preferência por solos permeáveis, onde o sistema radicular superficial se desenvolve melhor (Silva., 2007). Ecologicamente, *Pinus pinaster*, é uma das primeiras espécies arbóreas a colonizar um solo incipiente. As suas características biológicas mais relevantes são, a intolerância ao ensombramento, capacidade de vegetar em solos pobres e a grande produção de sementes com uma alta capacidade de dispersão. O seu carácter iminentemente pioneiro é de resto patente no sucesso que teve a sua utilização na fixação das dunas do litoral, em que foi introduzido, por sementeira, em areias, pobres em matéria orgânica e nutrientes (Silva, 2007).

### **1.1.3 – Importância do Pinheiro Bravo**

O pinheiro bravo é uma espécie de grande importância económica, pela sua capacidade de adaptação, produtividade e versatilidade de uso da sua madeira, sendo o sustentáculo das indústrias de serração, de painéis e aglomerados e de pasta de papel. O ritidoma (casca) tem interesse agro-económico, evita a compactação do solo servindo de protetor contra a precipitação, e, quando se degrada, enriquece o solo com matéria orgânica. O seu óleo essencial, apresenta características de grande relevância na indústria farmacêutica, constituindo um dos principais produtores de teribintina, substância composta essencialmente por  $\alpha$ -pineno, que se obtém através da destilação da resina (Martins *et al.* 2011).

## **1.2 – Doença da murchidão dos pinheiros**

### **1.2.1 – Nemátode da madeira do pinheiro**

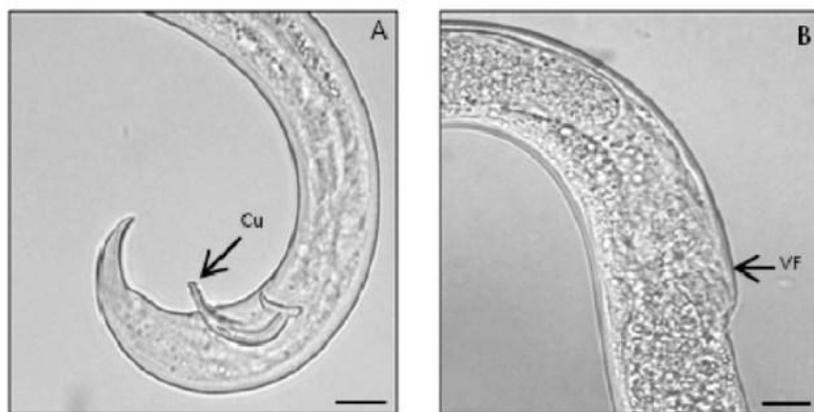
O nemátode da madeira do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner, 1934, Nickle (1970) pertence ao género *Bursaphelenchus* Fuchs, Ordem Aphelenchida e Família Parasitaphelenchidae, que engloba muitas espécies associadas ao declínio de espécies vegetais. Parasitas de árvores, e agentes causais de doenças com importância à escala mundial, temos o *Bursaphelenchus cocophilus*, responsável pela doença do anel vermelho “red ring disease” em coqueiros e palmeiras, sendo o inseto vetor o *Rhynchophorus palmarum* L. (Oehlschlager *et al.*, 2002), e o *Bursaphelenchus xylophilus*, agente causal da doença da murchidão dos pinheiros, sendo o seu inseto vetor o *Monochamus galloprovincialis*.

O NMP, foi pela primeira vez descrito nos Estados Unidos da América, de onde é originário, expandindo-se no início do século XX, através de madeira infetada para países do extremo oriente (Dwinell, 1997; Sathyapala, 2004). Em Portugal, foi descrito pela primeira vez em 1999, na zona de Marateca/Pegões. Desde então foi criado o programa PROLUMP – Programa Nacional de Luta contra o Nemátode da Madeira do Pinheiro, pondo em prática a delimitação das áreas afetadas, a prevenção da sua dispersão com a aplicação de medidas de contenção e de controle da população do inseto vetor, de forma a controlar e erradicar o nemátode, bem como a implementação de um sistema de monitorização (Mota *et al.*, 1999; DGRF, 2003).

Para combater e conhecer o nemátode, foi necessário conhecer o seu comportamento no ecossistema, e quais as condições ótimas para a sua propagação, uma vez que esta doença, resulta da interação complexa entre o nemátode, o hospedeiro e o inseto vetor.

### **1.2.2 – Caracterização do Nemátode da Madeira, *B. xylophilus***

O Nemátode da Madeira do Pinheiro, caracteriza-se por ser um parasita microscópico com um grande impacto na estabilidade do ecossistema das florestas e no comércio internacional. O *Bursaphelenchus xylophilus*, no seu estado adulto mede menos do que 1,5mm de comprimento, possui uma película fina e não é segmentado. As diferentes espécies do género *Bursaphelenchus*, distinguem-se pela presença simultânea de três características morfológicas: Espícula bem desenvolvida na região posterior do corpo, com uma curvatura forte e extremidade achatada, em forma de disco “cucullu”; na fêmea o lábio anterior da vulva com uma prega sobreposta bem distinta (Braash, 2001; Penas *et al.*, 2004)



**Figura 2-** Observação microscópica do macho e da fêmea de *Bursaphelenchus xylophilus*. (in Fonseca *et al.*,2012) A- Espícula curva do macho (Cu); B- Vulva sobreposta da fêmea (VF) Escala: Barra=10µm.

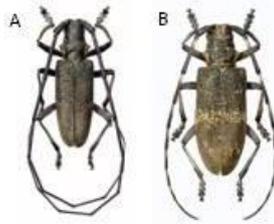
### 1.2.3 – Inseto Vetor (*Monochamus galloprovincialis*)

A transmissão do nemátode entre as diferentes árvores hospedeiras, dá-se através de um inseto vetor cerambicídeo, do género *Monochamus*, existindo 120 espécies distribuídas pela Ásia, África, Europa e América do Norte. Em Portugal a espécie predominante é o *Monochamus galloprovincialis* (Tomminen & Akar, 1990; Evans *et al.*, 1996).

O primeiro registo em Portugal do género *Monochamus*, remonta ao século XIX, sendo posteriormente revista a identificação por Oliveira (1894) para *Monochamus galloprovincialis* (Sousa *et al.*, 2001). O *Monochamus galloprovincialis*, caracteriza-se pela cor acastanhada ou negra, antenas avermelhadas ou muito escuras, sendo mais longas nos machos e com faixas brancas nas fêmeas (fig.3). Pubescência amarelada ou acinzentada, disposta em manchas irregulares na cabeça, pronoto e élitros (Chinery, 1986; Francardi & Pennacchio, 1996)

No período decorrente, de Abril a Outubro, inicia-se o período de voo, do inseto, que transmite o nemátode quando se alimenta dos ramos mais jovens da zona superior da copa de pinheiros saudáveis, seguindo-se a postura dos ovos em árvores mais enfraquecidas, resultante da infeção pelo nemátode.

A oviposição ocorre durante sete a nove semanas nas cicatrizes provocadas pelas mandíbulas da fêmea em árvores moribundas. A larva eclode seis a nove dias, conforme a temperatura, iniciando a escavação de uma galeria no tecido subcortical, tendo um período de alimentação que decorre por longos meses (Francardi & Pennacchio, 1996)



**Figura 3** – Imagos – **A:** Macho; **B:** Fêmea de *Monochamus galloprovincialis*

Após o acasalamento, que ocorre no tronco da árvore, a fêmea utiliza as suas mandíbulas para escavar fendas na casca do hospedeiro, preparando o local de postura. Posteriormente, escava uma galeria centrípeta para o interior da árvore, sendo nesta fase de desenvolvimento onde se encontra uma grande percentagem da população durante o Inverno. O número de estados larvares identificados para esta população, em Portugal, é entre quatro a seis e só ocorre uma geração por ano (Evans, *et al.*, 1996; Naves, 2007).

#### **1.2.4 – Interação nemátode – Hospedeiro – Inseto vetor e Sintomatologia**

O *Monochamus galloprovincialis* possuía uma interação estável com os pinheiros até à introdução do NMP em Portugal e fora das zonas afetadas. Este inseto coloniza as árvores mais debilitadas, dependendo assim do enfraquecimento das mesmas, para se reproduzir, causado por fatores bióticos ou abióticos (Berryman, 1986; Cabral, 1995)

A relação que se estabelece entre o inseto e o nemátode é fator obrigatório, uma vez que o mesmo só é transferido para um hospedeiro saudável, através do inseto vetor (Begon *et al.*, 1990). A transmissão do nemátode do inseto vetor para o novo hospedeiro, ocorre de forma primária, quando o nemátode penetra diretamente na árvore multiplicando-se e alcançando a maturação adulta. Este fenómeno dá-se, uma vez que o nemátode é transportado nas traqueias do inseto vetor, que ao alimentar-se da casca e do floema dos ramos das copas das árvores, liberta o nemátode para a hospedeiro. Em menor escala, dá-se a transmissão secundária, que ocorre durante a oviposição pelas fêmeas, em árvores enfraquecidas ou mortas (Naves, 2007).

Quando o nemátode penetra a árvore, inicia a fase propagativa fitófaga, multiplicando-se rapidamente, sendo a população composta por adultos e estados larvares (Mamiya, 1984). O terceiro estado larvar (J3) pode desenvolver-se originando adultos Quando as condições se tornam adversas assume uma forma resistente (Jm) (Warren & Linit, 1993). Este estado é muito comum no hospedeiro, durante o Inverno, uma vez que o nemátode neste estado larvar acumula reservas lipídicas permitindo-lhe hibernar (Maehara & Futai, 2001).

A fase dispersiva é caracterizada pela formação de larvas de resistência (Jiv) (Dauerlarvae), podendo ser despoletada por substâncias químicas específicas, ou alterações no teor de CO<sub>2</sub> no interior da câmara pupal (fig.4) (Necibi & Linit, 1998; Stamps & Linit, 2001).

Quando as árvores entram em declínio, são colonizadas por fungos, passando assim o *Bursaphelenchus xylophilus*, para a fase micetófaga (Mamiya, 1984).



**Figura 4** – Ciclo de dispersão do nemátode da madeira do Pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus* ([www.syngenta.com](http://www.syngenta.com))

#### 1.2.4.1 – Sintomatologia

A gravidade dos sintomas da incidência da murchidão do pinheiro depende de fatores intrínsecos, tais como a temperatura, espécie de hospedeiro e altura em que ocorre a dispersão do inseto vetor. Após a infeção de pinheiro bravo com o nemátode, observam-se os sintomas, ao fim de algumas semanas, a que se segue o amarelecimento e murchidão das agulhas das copas. Este amarelecimento dá-se devido à colonização do

nemátode nos canais resiníferos, provocando a paragem da produção da resina, seguindo-se a cavitação do xilema e consequente interrupção da ascensão da seiva bruta.

### **1.3 – Patogenicidade do Nemátode da Madeira do Pinheiro**

A expressão da doença da murchidão dos pinheiros, depende do nível de virulência do nemátode e do grau de tolerância da árvore hospedeira. Existem espécies com capacidade de sobreviver com a presença do nemátode, apresentam diferentes graus de resistência, quando o hospedeiro tem a capacidade de dificultar a presença e multiplicação do nemátode, conseguindo por vezes recuperar dos danos infligidos (Mussel, 1980; Takemoto & Futai, 2007). O fenómeno de tolerância ou resistência verifica-se em árvores autóctones, Norte-Americanas, assim como em algumas espécies da zona da Ásia, mais precisamente da zona de Yunna, segundo Evans (1996) *Pinus yunnanensis*, é um hospedeiro considerado tolerante ao nemátode.

#### **1.3.1- *Pinus yunnanensis***

O *Pinus yunnanensis*, é uma conífera, pertencente à família das Pináceas, com polinização entre Abril e Maio, amplamente distribuída no sudoeste da China (Dan & Wu, 1991). É uma espécie de crescimento rápido, tolerante a solos secos e pobres, alcançando alturas de 52 metros. As folhas apresentam-se em cachos de três, de cor verde escura, medindo cerca de 10 a 30 centímetros. Esta espécie desempenha um papel importante tanto na economia como a na ecologia da Região de Yunna (Xu *et al.* 2012).

### **1.4 - Melhoramento para a resistência ao nemátode na madeira de pinheiro**

Apesar de ser claro que a expressão da Doença da Murchidão do Pinheiro provocada por *Bursaphelenchus xylophilus* é influenciada pelas condições ambientais, nomeadamente a existência de temperaturas médias de verão acima de 20°C, existe evidência também na literatura, que algumas espécies parecem ser intrinsecamente resistentes ao nemátode, independentemente das condições edafoclimáticas (Evans *et al.*, 1996). Para a mesma espécie, tem-se verificado a existência de árvores que sobrevivem à pressão da doença, apresentando-se assim, como candidatas a resistentes, constituindo deste modo uma oportunidade para o melhoramento seletivo. Esta tem sido a abordagem seguida nos programas de melhoramento desenvolvidos na China e no Japão, nos últimos 30 anos, que se têm desenvolvido da seguinte forma: 1-) seleção de árvores candidatas a resistentes, em zonas muito afetadas pela doença 2-)

estabelecimento de ensaios de descendência a partir de árvores candidatas e consequente inoculação com *Bursaphelenchus xylophilus* para determinação do fenótipo de susceptibilidades; 3-) seleção de genótipos com os mais elevados graus de tolerância; 4-) cruzamentos controlados entre os genótipos selecionados; 5-) instalação de pomares de semente. Utilizando este programa de melhoramento, foram desenvolvidas no Japão, 294 variedades de *Pinus* resistentes a *Bursaphelenchus xylophilus*, 204 de *Pinus densiflora* Siebold et Zuccarini e 90 de *Pinus thunbergii* Parl, com a instalação de pomares clonais de variedades resistentes (dados de 2009 do Forest Tree Breeding Center, Japão). As atuais tecnologias baseadas na genómica são uma mais-valia para o melhoramento de espécies lenhosas, bem como para a gestão do estado sanitário das florestas (Neale, 2007). Um dos grandes objetivos dos estudos moleculares efetuados em populações de lenhosas, e em estudos de genética da evolução, é identificar a função dos genes responsáveis pela variação natural em características que afetam a adaptação, e resultam em mudanças evolucionais através da seleção e adaptação ao ambiente. De igual modo, os melhoradores procuram identificar polimorfismos responsáveis por caracteres agronómicos e florestais importantes, possibilitando um recurso importante para o melhoramento genético de plantas, através da seleção direta de alelos envolvidos no carácter de interesse (Hausman *et al.*, 2004, Boerjan, 2005). Nas árvores florestais, os caracteres adaptativos possuem tanto relevância adaptativa como agronómica e/ou florestal, sendo a variabilidade genética a base da biodiversidade. Variações existentes na sequência dos genes e das suas regiões de regulação, estão na base da variação fenotípica que tem sido explorada pelo Homem no melhoramento das culturas.

O genoma de pinheiro bravo (*Pinus pinaster* Ait) é muito grande (até 23.8Gb, 150 vezes maior do que o genoma de *Arabidopsis thaliana*) (Lepointevin *et al.*, 2010). Apesar da sua grande importância económica no Sudoeste da Europa, onde cobre 4Milhões de hectares, serão necessários muitos anos até a totalidade do genoma estar sequenciado. Existem, no entanto, já cerca de 800.000 ESTs de *Pinus pinaster* em bases de dados, produzidas na década anterior, com a re-sequenciação de 40 genes relacionados com a qualidade da madeira e resistência à secura (Pot *et al.*, 2005, Eveno *et al.*, 2008).

Os registos de resposta de espécies de género *Pinus*, a nível molecular, relacionados com o stress biótico induzido por *Bursaphelenchus xylophilus* dizem respeito ao isolamento e análise de genes sobre-expressos, ou induzidos de novo, em resposta à inoculação de *Pinus densiflora*, com o nemátode da madeira de pinheiro (Shin *et al.*, 2009) e ainda à identificação de genes diferencialmente expressos em *Pinus pinaster* e *Pinus pinea* após infeção com *Bursaphelenchus xylophilus* (Santos e Vasconcelos,

2011) . Para o melhoramento da resistência ao NMP, a genômica e a transcritômica são áreas a investir, em termos de investigação científica, de forma a identificar recursos genômicos: genes, promotores, vias biossintéticas, e marcadores moleculares ligados à resistência, para utilização em programas ulteriores de melhoramento genético, para as espécies *de Pinus*.

#### **1.4.1- Genes candidatos à resistência ao nemátode**

A resistência de plantas a doenças está associada a um conjunto de respostas de defesas ativadas, envolvendo vias de transdução de sinal integradas. A ativação destas respostas em plantas depende do reconhecimento ao nemátode, iniciando-se o mecanismo de defesa que limita a infecção. A resistência manifesta-se através de uma resposta de hipersensibilidade, que resulta da morte celular, localizada no local onde foi efetuada a inoculação pelo inseto vetor. As células da planta ao redor do local de infecção, sofrem necrose rápida, sendo esta resposta provocada por alterações metabólicas que visam impedir o desenvolvimento do nemátode (Van Loon & Van Strien, 1999). Esta defesa é composta por uma resposta constitutiva, a qual já está presente nas plantas, e por uma resposta induzida, a qual ocorre após o ataque de fitopatógenos, ou no início de stress abiótico. A ativação do mecanismo de defesa da planta ocorre por meio de sucessivos eventos e sinais que se iniciam no reconhecimento pela planta do agente agressor e culmina com a ativação das barreiras físicas e químicas envolvidas no processo. De entre as defesas utilizadas pelas plantas estão a resposta hipersensitiva, resistência sistêmica adquirida, indução de proteínas relacionadas com a patogênese e síntese de compostos sinalizadores, como por exemplo, ácido salicílico e peróxido de hidrogênio. (Agrios, 2004; Verbene *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2000) As proteínas relacionadas com a patogênese (PRs), são definidas como proteínas codificadas pela planta hospedeira e induzidas especificamente num estado patológico (Edreva 2005). Estudos recentes indicam que a ativação dos genes que codificam PRs ocorre a poucas horas após a infecção (Baldo *et al*, 2010). Estes genes são ativados aquando do reconhecimento de determinados efetores (Schiffer *et al*, 1997). Os genes escolhidos para este trabalho, tiveram como apoio um estudo realizado no *Pinus densiflora*, antes e após a infecção com NMP, desenvolvido por Shin *et al.*, (2009). Este estudo consistiu em perceber quais os genes diferencialmente expressos após infecção com NMP. Segundo os autores proteínas relacionadas com a patogênese, assim como enzimas ligadas ao stress oxidativo, apresentaram expressões significativas.

#### **1.4.1.1- *Thaumatin like protein***

TLPs são polipeptídeos com cerca de 200 aminoácidos. Dada à sua expressão induzida por stress biótico (provocado por fungos, nemátodes, bactérias) e stress abiótico, são classificadas como proteínas pertencentes às PRs, especificamente à família das PR-5 (Christensen *et al.* 2002; Van Loon *et al.* 2006).

As TLPs destroem as paredes celulares do patógeno, utilizando uma variedade de enzimas, prejudicando o seu desenvolvimento, impedindo o seu crescimento (Liu *et al.*, 2010; Zareie *et al.*, 2002).

#### **1.4.1.2- *Endo-chitinase***

Quitinases, catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, ligação presente em biopolímeros de N-acetilglucosamina, principalmente em quitina. Quitinases estão presentes em vários organismos. Dependendo do organismo de origem, estas enzimas têm diferentes funções. Em animais e plantas, estas desempenham um papel na defesa do organismo contra o ataque patogénios. As quitinases podem ser divididas em duas categorias: exo-quitinases, demonstrando atividade apenas para a extremidade não redutora da cadeia de quitina, e endo-quitinases, que hidrolisam  $\beta$ -1,4-glicosídeo (Kasprzewska, 2003). Em espécies de nemátodes, tem sido documentada a presença de quitina. A quitina é um homopolímero com ligação 1,4- $\beta$  N-acetil-D-glicosamina, que é degradada pela ação de endo-quitinases que hidrolisam as ligações 1,4- $\beta$  (Veronico *et al.*, 2001).

#### **1.4.1.3- *Pinosylvin synthase***

A *pinosylvin synthase* (3,5-dihydroxystilbene ) é uma enzima pertencente à família das transferases, no género *Pinus*. Os estilbenóides, *pinosylvin* e o seu éter de monometilo, são metabolitos principais que podem matar nemátodes (Kodan *et al.*, 2002).

Esta enzima participa na biossíntese dos fenilpropanóides, que são uma grande família de metabolitos secundários envolvidos na resposta a stress bióticos e abióticos. Estilbenos são derivados da via metabólica dos fenilpropanóides, envolvidos na defesa da planta contra o patógeno (Chong *et al.*, 2009). *Pinosylvin* é um estilbeno comum no cerne de *Pinus*, que mostra atividade nematicida (Kuroda & Kuroda, 1998).

#### **1.4.1.4- *Superoxide dismutase-like protein***

A formação de barreiras físicas na planta, pode ser um fator que impede a migração do nemátode, bem como o seu desenvolvimento. Algumas dessas barreiras, designam-se

por lenhificação e suberização. A superoxide dismutase é uma enzima que catalisa a dismutação do superóxido em oxigénio e peróxido de Hidrogénio. O peróxido de hidrogénio através da via das peroxidases, induz o desenvolvimento de lenhina, fortalecendo as paredes celulares da planta e consequentemente, retarda a migração do nemátode na planta (Fenoll *et al.*, 1997).

#### **1.4.1.5- Allene Oxyde Cyclase**

A *allene oxyde cyclase* é uma enzima chave na biossíntese do ácido jasmónico (JA), a qual catalisa a reação em que se forma o primeiro metabolito cíclico e biologicamente ativo, o ácido 12-oxo-fitodienólico (Hause *et al.*, 2003; Schaller *et al.*, 2008). Os jasmonatos, hormonas vegetais e moléculas sinalizadoras, têm funções regulatórias no desenvolvimento e adaptação a stresses bióticos e abióticos. A biossíntese do ácido jasmónico é regulada ao nível da transcrição (Moreira *et al.*, 2009), em particular da *allene oxyde cyclase*.

### **1.5 – Histopatologia**

A doença da murchidão dos pinheiros que conduz as árvores infetadas à morte, num intervalo de poucas semanas ou meses, compreende duas fases de infeção: uma fase inicial, em que não há sintomas externos da doença, e uma fase avançada, quando a sintomatologia se traduz numa redução brusca da produção de resina e num rápido amarelecimento das agulhas das copas (Kiyohara & Tokushige, 1971). A ulterior invasão e destruição do câmbio, dos canais resiníferos do xilema e dos restantes tecidos corticais, que se revela pela formação de vacúolos contendo taninos (Nobuchi *et al.*, 1984), provoca a cavitação do xilema e consequente interrupção da ascensão da seiva bruta (Son *et al.*, 2009). Assim sendo, a histopatologia permite-nos avaliar morfológicamente o estado de infeção da planta, avaliando os danos dos tecidos e possível visualização do nemátode.

#### **1.5.1 – Inclusões de amido**

O amido é um polissacárido sintetizado pela planta durante a fotossíntese, utilizado para reservas energéticas. Muitos estudos têm sido realizados, de forma a conhecer o metabolismo do amido (Hofmann, *et al.*, 2008) Recentemente por Engler, *et al.* (2004) em modelo de *Arabidopsis* defendem que o nemátode induz a formação de amido. Estes ensaios ocorreram em raízes, pelo ao facto da grande maioria de nemátodes existirem no solo. Estas inclusões de amido, localizam-se em sincícios, e os nemátodes alimentam-se deste nutriente. Sincícios são estruturas multinucleadas, ou seja, várias células

mononucleadas e justapostas que perderam as membranas celulares e constituem uma massa citoplasmática com vários núcleos. Estes sincícios tornam-se metabolicamente ativos, no entanto, ainda é desconhecida a maneira como o nemátode induz a formação de sincícios. Pensa-se que se deve a proteínas produzidas pelas células glandulares esofágicas do nemátode que poderão estar envolvidas nesta atividade (Szakasits, 2009). Neste caso, Engler, *et al.* (2004) defende que há uma relação direta na taxa de desenvolvimento do nemátode e a quantidade de amido. No entanto, outros estudos também estão relatados como o amido sendo uma barreira física contra o nemátode. Bolla *et al.* (1987), fez um estudo com diferentes espécies do género *Pinus*, em que segundo estes autores, intermediários dos carboidratos, são percussores da síntese de terpenos e polifenóis, componentes utilizados como defesa das plantas contra o nemátode.

#### **1.6 -Os objetivos específicos deste trabalho são os seguintes:**

1- Perceber e comparar a distribuição e propagação do nemátode no interior da planta, após inoculação com NMP, em plantas de três anos, de uma espécie susceptível, *Pinus pinaster* Ait e de uma espécie resistente *P yunnanensis* Franch;

2- Comparar a expressão de um conjunto de genes relacionados com a resistência a stresses bióticos, por Real Time-qPCR, em *Pinus pinaster* e na espécie resistente *Pinus yunnanensis*, em resposta à infecção com *Bursaphelenchus xylophilus*, selecionados na base de dados EuroPine DB (Fernández-Pozo *et al.*, 2011) e em Shin *et al* (2009).

Este trabalho teve como objetivo final selecionar os TAI (Tempos Após Inoculação) relevantes, em termos de expressão de genes candidatos de resistência a stresses bióticos, para mais tarde, os utilizar numa abordagem de transcritômica, recorrendo à sequenciação em massa de bibliotecas de cDNA construídas a partir das duas espécies, para os tempos mais relevantes em termos de expressão génica, com o objetivo de identificar e comparar os genes diferencialmente expressos, em resposta à infecção com NMP.

## 2- Material e Métodos

### 2.1 – Material Biológico

#### 2.1.1 – Material Vegetal

O material vegetal utilizado neste estudo consistiu em 34 plantas envasadas, de 3 anos de idade de *Pinus pinaster* (*Pp*) e de *Pinus yunnanensis* (*Py*), que foram mantidas durante o ensaio, em condições ambientais naturais. As plantas de *Pp* foram produzidos nos viveiros de Alcácer do Sal, a partir de semente, enquanto as sementes da espécie *Py* vieram da China no ano de 2009, e semeadas na Escola Superior Agrária de Coimbra.



**Figura 5-** **A:** Espécie *Pinus pinaster*; **B:** Espécie *Pinus yunnanensis*

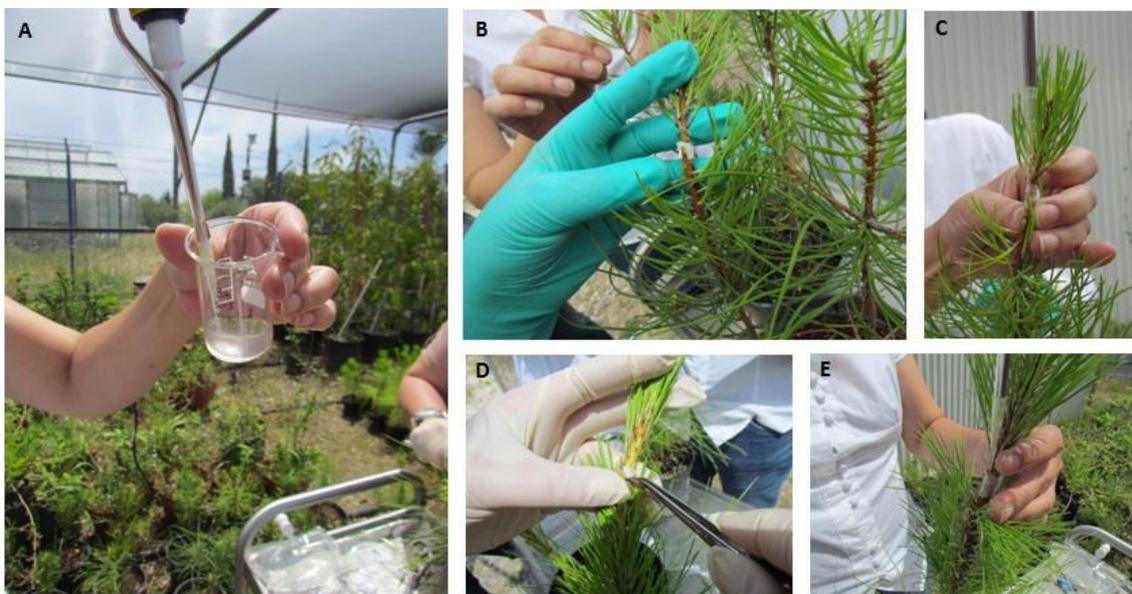
##### 2.1.1.1 - Cultura e extração de *Bursaphelencus xilophilus* (*Bx*)

A cultura de *Bx* foi feita em placas com meio PDA (*Potato Dextrose Medium*), inoculadas com um fungo filamentoso, *Botrytis cinerea*, não esporulado. A este meio foi adicionado uma suspensão de nemátodes que, após um crescimento significativo, foram repicados para um tubo de ensaio com grãos de cevada ( $\frac{1}{2}$  do tubo de ensaio) com 5 mL de água. O crescimento em PDA serve para estabelecer a população de *Bx*, enquanto a cevada serve para obter quantidades em grande escala de *Bx*. Estes tubos de ensaio foram esterilizados e mantidos a 25°C e a uma humidade relativa de 70%, condições ótimas para o crescimento de nemátodes. A sua extração foi efetuada de modo passivo, isto é, de um número significativo de indivíduos, a cevada é embrulhada em papel absorvente e em pano, e colocada em água, durante 48h. Após as 48h, a água é passada por um crivo e obtemos as nossas culturas puras de *Bx*, que posteriormente são colocados a 4°C, com o objetivo de parar a sua multiplicação e passagem de estágio juvenil a adulto.

## 2.2 Ensaio de patogenicidade com *Bursaphelenchus xylophilus* e colheita de material vegetal

### 2.2.1 – Ensaio experimental

Para este ensaio, foram utilizadas 15 plantas de cada espécie para inoculação e 2 plantas para controlo (incisão com água). Para se proceder à inoculação, foi feita uma incisão na planta, no lanço do ano, com cerca de 1cm no sentido vertical, sendo cada planta inoculada com 2 000 nemátodes/100 $\mu$ L água. Uma vez que os nemátodes precisam de humidade para se poderem movimentar, na incisão continha um tecido (gaze) e revestiu-se a zona envolvente com parafilme para manter a humidade (fig.6).



**Figura 6** – Ensaio de inoculação com *Bursaphelenchus xylophilus*; **A**: Suspensão de 20000 nematodes/mL (inóculo); **B e C**: Inoculação em *Pinus pinaster* Ait; **D e E**: Inoculação em *Pinus yunnanensis* Franch; ambas as espécies com 3 anos de idade.

Para a colheita do material vegetal foram estabelecidos 5 tempos após inoculação: 6h, 24h, 48h, 7 dias e 15 dias. Após a inoculação, e em cada tempo, foi feita a colheita de 3 plantas de cada espécie. Cada uma das plantas foi dividida para extração de RNA: zona de inoculação, lançamento do ano), sendo a restante planta utilizada para contagem de nemátodes e para histologia (tabela 1 e Fig. 7).

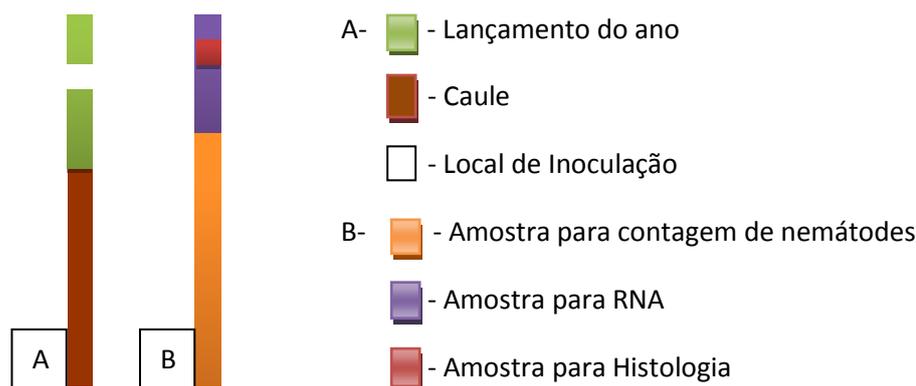
**Tabela 1:** Esquema representativo da recolha do material vegetal

Espécies	T0	T1(6h)	T2(24h)	T3(48h)	T4(7d)	T5(14d)	Total
<i>P. pinaster</i> (17plantas, 15 inoculadas)	2 (E+C+H)	3 (E+C)	3 (E+C)	3 (E+C)	3 (E+C+H)	3 (E+C+H)	17
<i>P.yunnanensis</i> (17plantas,15 inoculadas )	2 (E+C+H)	3 (E+C)	3 (E+C)	3 (E+C)	3 (E+C+H)	3 (E+C+H)	17

\*C – contagem de nemátodes

\*E – Extração de RNA

\*H – Histologia



**Figura 7** – Esquema representativo da recolha de amostra para cada estudo deste trabalho. **A:** Corresponde à planta e local de inóculo; **B:** Planta dividida para os diferentes estudos.

### 2.2.2- Contagem de nemátodes da amostra inoculada

A contagem de nemátodes, faz-se através de uma extração passiva, tal como a extração executada para obtenção de linhagens puras de *Bx*. Após a extração, os nemátodes foram transferidos para uma placa de Petri, a qual foi observada por Lupa eletrónica OLYMPUS SZX12, para contagem dos mesmos.

A contagem de nemátodes é importante, de modo a podermos saber se obtivemos uma boa inoculação, uma vez que com o passar do tempo, deverá haver um aumento significativo da população no interior da planta, provocando assim a infeção da mesma.

### 2.2.3 - Histologia

Os segmentos das plantas com cerca de 1cm foram fixados (no mínimo 48h) em FAA (1:1:18) (formaldaido: acido acético: etanol 70%) a 4°C (Johansen, 1940; Ruzin, 1999). A desidratação foi realizada numa série progressiva de álcoois 70% - 80%- 90% - 100%, sendo o álcool substituído por xilol noutra série progressiva até xilol puro. A inclusão foi realizada em parafina 58-60°C. O material incluído foi seccionado a 12 µm,

num micrótomo rotativo Leica RM2255 e corado com Azul de Toluidina. Os cortes foram observados num microscópio ótico (Olympus BX41) e a aquisição de imagem realizada com o equipamento ProgRes® CapturePro 2.8 - JENOPTIK Optical Systems e capturadas com o programa ProgRes® Systeme - JENOPTIK Optical Systems. Como comparação entre espécies e observação da organização celular, efetuaram-se cortes transversais de ambas as espécies, analisando-se partes distintas da planta, tais como, epiderme, parênquima, canais de resina e medula. Seguidamente, procedeu-se o mesmo esquema de trabalho para as amostras com infeção aos 7 dias e 15 dias. Posteriormente, foi feita uma análise à quantidade de amido existente em cada espécie, utilizando solução de Lugol, assim como localização específica do nemátode nos diferentes tecidos, utilizando como corante Solução composta por ácido láctico (45%) + ácido acético (45%) e tinta Rotring (Blue Ultramarine Brilliant) na proporção 120:4:0.1. Foi colocada 1gota na lâmina c/ corte e esperou-se 1-2h p ara diferenciação de coloração (Naves, AC, 2008)

## **2.3 – Ácidos nucleicos**

### **2.3.1 – Extração de DNA**

A extração do DNA foi feita utilizando o mini-kit da Quiagen, segundo as instruções do fabricante a partir do lançamento do ano, em 10 plantas, 2 de cada espécie, nos diferentes tempos de estudo referidos anteriormente. A quantificação do DNA foi determinada por comparação do fago  $\lambda$  com concentrações conhecidas, de 25 e 100 ng/ $\mu$ L, corridos simultaneamente em gel de agarose a 1% em TBE 1x. A quantificação também foi efetuada por NanoDrop spectrophotometer ND - 1000 Alfagene.

### **2.3.2 – Identificação de *Bursaphelenchus xylophilus* por PCR multiplex**

Para a identificação de *Bx*, procedeu-se inicialmente à extração de DNA de duas espécies diferentes, *Bursaphelenchus xylophilus* e *Bursaphelenchus mucronatus*, (sendo o último não patogénico), de modo a obtermos um controlo positivo para comparação dos resultados obtidos, das extrações realizadas a partir de amostras inoculadas. Para a extração, recorreu-se ao procedimento utilizado por Zhuo, k. *et al* (2011), com alguns ajustamentos do protocolo. Num eppendorf de 1,5 mL colocou-se 20 $\mu$ L de água e alguns nemátodes, adicionando a esta suspensão azoto líquido para maceração, de modo a romper a parede celular. O seguimento do protocolo, a partir deste ponto, foi de acordo com o procedimento dos autores. Foi realizada uma reação de PCR em

multiplex, utilizando primers específicos para a espécie, e utilizou-se DNA de amostras inoculadas com nemátode.

### 2.3.3- Extração, purificação e quantificação de RNA

O material colhido (lançamento do ano) foi macerado em azoto líquido. A extração de RNA foi efetuada de acordo com os autores Provost *et al*, (2007), utilizando-se cerca de 2g de material vegetal. Após o processo de extração, as amostras foram tratadas com o kit TURBO DNase da Ambion, segundo as instruções do fabricante. De seguida, utilizou-se o protocolo RNA Cleanup do kit RNeasy Plant Mini Kit da Qiagen, de forma a garantir um elevado grau de pureza do RNA. A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose a 1%, tendo-se procedido à sua desnaturação em banho seco a 70°C, durante 10min. A concentração de RNA foi obtida através de NanoDrop spectrophotometer ND - 1000 Alfacene. Para utilização do RNA para q- RT-PCR, diluíram-se as amostras de modo a obter 1 µg de RNA /µL (tabela 2a e 2b).

**Tabela 2a** - Concentrações e diluições de [RNA], *Pinus pinaster*\*

		<i>Pinus pinaster</i> inoculado							
	Amostra	[RNA] ng/µL	Qtd (µg)	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>	V <sub>RNAtotal</sub> (µL)	Diluição		VµL para cDNA (1µg)
							V <sub>H2O</sub> (µL)	V <sub>total(H2O+RNA)</sub>	
T <sub>1</sub>	Pp2A	1423,7	34,2	1,99	2,41	2	2	4	1,40
	Pp2B	1113,7	26,7	2,13	2,4	2	2	4	1,80
	Pp3A	1420,6	34,1	2,13	2,37	2	2	4	1,41
T <sub>2</sub>	Pp3B	1651,7	39,6	2,1	2,4	2	2	4	1,21
	Pp4A	2675,4	64,2	2,03	2,3	2	6	8	1,50
	Pp4B	2337,3	56,1	2,1	2,4	2	4	6	1,28
T <sub>3</sub>	Pp5	2478,2	59,5	2,12	2,41	2	6	8	1,61
	Pp7A	1258,3	30,2	1,97	2,32	2	2	4	1,59
	Pp7B	2264,2	54,3	2	2,27	2	4	6	1,32
T <sub>4</sub>	Pp9	2024,7	48,6	1,89	2,26	2	4	6	1,48
	Pp10A	1864,1	44,7	1,92	2,21	2	4	6	1,61
	Pp10B	2755,3	66,1	2,07	2,32	2	6	8	1,45
	Pp11B	3838,9	92,1	2,04	2,32	2	8	10	1,30
T <sub>5</sub>	Pp12A	1266,8	30,4	2,01	2,37	2	2	4	1,58
	Pp12B	1813,2	43,5	1,94	2,16	2	4	6	1,65

**Tabela 2b** - Concentrações e diluições de [RNA], *Pinus yunnanensis*\*

Pinus yunnanensis Inoculado									
Amostra	[RNA]	Qtd(µg)	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>	V <sub>RNA total</sub> (µL)	Diluição		V <sub>µL para cDNA (1µg)</sub>	
						V <sub>H<sub>2</sub>O</sub> (µL)	V <sub>total(H<sub>2</sub>O+RNA)</sub>		
T <sub>1</sub>	Py3	2539,3	60,9	1,96	2,35	2	4	6	1,18
	Py4	2371	56,9	1,94	1,83	2	4	6	1,27
	Py5	1433	34,4	1,99	2,36	2	2	4	1,40
T <sub>2</sub>	Py6	2297,2	55,1	1,95	2,25	2	4	6	1,31
	Py7	1981,5	47,6	2,13	2,43	2	4	6	1,51
	Py8	1877,2	45,1	2,01	2,39	2	4	6	1,60
T <sub>3</sub>	Py9	2006,1	48,1	2,09	2,4	2	4	6	1,50
	Py10	2254,1	54,1	2	2,29	2	4	6	1,33
	Py11	3311,4	79,5	2,06	2,38	2	6	8	1,21
T <sub>4</sub>	Py12	2084,3	50,0	1,96	2,27	2	4	6	1,44
	Py13	1198,6	28,8	2,02	2,36	2	2	4	1,67
	Py14	2123,1	51,0	2	2,34	2	4	6	1,41
T <sub>5</sub>	Py15	2415,9	58,0	1,95	2,33	2	4	6	1,24
	Py16	811	19,5	2	1,8	2			
	Py17	1101,8	26,4	2,01	2,37	2	2	4	1,82

\*Em ambas as tabelas estão disponíveis as concentrações de RNA nas diferentes amostras, assim como as diluições executadas para utilização ulterior do RNA para síntese de cDNA. As absorvâncias também estão disponíveis as quais devem respeitar um valor de  $\geq 2$  de modo a avaliar contaminações existentes

### 2.3.4 – Síntese de cDNA

A síntese de cDNA ocorreu a partir de 1 µg de RNA total, a partir de cada uma das amostras, usando o kit ImProm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcription System da Promega. A reação ocorreu num volume final de 20µL, 0,5µg de Oligo (dT) e 1µL de transcriptase reversa, segundo as instruções do fabricante.

## 2.4- Seleção de genes candidatos de resistência e desenho de primers

### 2.4.1 – Genes de resistência

Numa primeira abordagem, foi feita uma pesquisa bibliográfica para a seleção de genes candidatos de resistência ao nemátode. Os genes selecionados de acordo com Shin *et al.* (2009) foram: Thaumatin-like protein (*tlp*), Superoxide dismutase-like protein (*sdlp*), Endochitinase (*end*), Pinosylvin synthase (*ps*). Um outro gene candidato é a Allene Oxyde Cyclase (*aoc*) e, recorrendo à base de dados da Europe DB

([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)), obteve-se Expressed Sequence Tags (ESTs), para ulterior desenho de primers.

#### 2.4.1.1 – Desenho de primers

O desenho de primers foi executado em duas fases distintas, apenas para o gene *aoc* e *epdb*. Para os restantes genes os primers foram obtidos a partir de Shin *et al.*, (2009). Numa primeira fase a sequência dos genes *aoc* e *epdb* foram submetidos a um BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) no Gene Index (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>) contra as coleções de espécies de Pinus, principalmente *Pinus pinaster*, para obter sequências EST. As ESTs foram escolhidas consoante o melhor score (>250). As sequências do gene, juntamente com a EST escolhida, foram alinhadas a partir do programa Multalin obtendo-se sequências consensos (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). O desenho de primers, para estas sequências, foram desenhados com o recurso ao software Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Na tabela 3, estão descritas os vários primers utilizados para este estudo. Os genes de referência foram obtidos através do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) para sequências conhecidas do género *Pinus*.

**Tabela 3** – Sequências de primers para genes de referência e genes de estudo a usar em qRT-PCR em tempo real\*

Gene	Descrição dos genes	Primer Sequência
<b>EPDB</b>	Elongation factor-1 alpha	F 5'- TGTTCTGTGCTTCTGATTCTCCAG -3' R 3'- TGTAGATCAAATGCCAGTGGTTG -5'
<b><math>\alpha</math> tubulina</b>	alpha_TUB_taeda (aTUB_tae)	F 5'- AGGAAGGTGATGAGGGAGACGA -3' R 3'- CTGCAATAACGGGAACAACACA -5'
<b>18S</b>	Pinus taeda 18S rRNA (M82462) (18S_tae)	F 5'- GATCAGATACCGCCTAGTCTCAA -3' R 3'- GAACCCAAACACTCTGATTTCTC -5'
<b>EF1-tae</b>	EF1-a (elongation factor)_taeda (EF1-a_tae)	F 5'- AACTGGAGAAGGAACCCAAG -3' R 3'- AACGACCCAATGGAGGATAC -5'
	SAND_arabidopsis (SAND_ath)	
<b>SAD</b>		F 5'- CGATATGACACCCTTGCTTGGA -3' R 3'- ACGCATATGGAAGGGGAAGACA -5'
<b>EF1-pin</b>	EF1-a (elongation factor)_pinaster (EF1-a_pin)	F 5'- AAGAAGGAACCTAGTGGTGCAAAG -3' R 3'- AAGCATGGAAGCACACGAAATG -5'
<b>TLP</b>	Thaumatococcus-like protein	F 5'-ATCTGCCTCTTTCCACAACCTCCCT-3' R 3'-AAGCACTATCGCATCCATCGACCA-5'

<b>END</b>	Endochitinase	F 5'-AGTCCGGACCAGCTTTACTGTGAT-3' R 3'-TTCCAGTAAATAGGCAGGGCACCA-5'
<b>SDLP</b>	Superoxide dismutase-like protein	F 5'-GTTGGGTGTGGCTGGGCTTAAATA-3' R 3'-TCCTAGCAATGGCAGCAAACCT-5'
<b>PSS</b>	Pinosylvin synthase	F 5'-CATCGGTGGGAAGGTGAGAG-3' R 3'-CGGATATTTTGAAGTACTGAAACG5'
<b>AOC</b>	Allene Oxyde Cyclase	F 5'-AGCCCTGCTTACCTTCGTCTG-3' R 3'-CTTGCAGGAAAATGCTGGATAAG-5'

*\*Sequências de primers usados para qRT-PCR, dos quais EF1-pin, EPDB,  $\alpha$  tubulina, 18S, Efl-tae, SAD e actina são genes de referência; Os restantes 5 são os genes de estudo.*

Desta pesquisa foram selecionadas as sequências que pertencem a genes normalmente descritos como genes de referência. Todas estas sequências foram submetidas ao software Prime 3, para desenho de primers. Todas as combinações de primers foram testadas com um PCR com temperatura de annealing de 60°C, template DNA e cDNA (1µL), 1 µL de 10µM dNTPs, 0,16 µL de 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 0,8 U de GoTaq DNA polymerase da Promega. As condições de PCR foram as seguintes: desnaturação a 94°C durante 5min; 34 ciclos com desnaturação a 94°C durante 45s, emparelhamento dos primers a 60°C durante 30s, e extensão a 72°C durante 1min; extensão final a 72°C durante 10min.

## 2.5- RT-PCR em tempo Real

### 2.5.1 - Réplicas Biológicas

Para cada um dos tempos em estudo, foram recolhidas 3 amostras de cada uma das espécies, tendo sido a amostra recolhida para extração de RNA, a parte correspondente ao lançamento do ano. A partir das amostras de RNA foram sintetizados os respetivos cDNAs.

### 2.5.2 – Amplificação de cDNA

As reações de qRT-PCR em tempo real decorreram num volume final de 20 µL, sendo o meio de reação constituído por iQ Syber Green Supermix 1x da Bio-Rad, 0,4 µL 10nM de cada um dos primers e 2 µL de cDNA (sintetizado a partir de 1µg de RNA total). O sistema de deteção iCycler iQ Real-Time PCR da Bio-Rad foi programado da seguinte forma: 95°C durante 3 min para ativação enzimática; 45 ciclos de 95°C durante 30s, 60°C durante 30s, 72°C durante 1min (momento em que é registada a medição da fluorescência). Para determinar a amplificação foi construída por curva de melting, por leituras sucessivas de 10s, a começar a 55°C e a terminar a 95°, variando 0,5°C por ciclo (81 ciclos). Com recurso ao software iQ5 Optical System versão 2.0 da Bio-Rad foi

possível determinar os valores de  $C_t$  (cycle threshold), que traduz a quantificação da expressão. O valor de  $C_t$  define-se pelo número de ciclos necessários para a visualização da fluorescência. Este valor é retirado do início da fase linear da exponencial. Os produtos de RT-PCR foram sujeitos a uma electroforese a 2% para confirmação da existência de um só produto amplificado.

### **2.5.3- Eficiência específica de Amplificação**

A eficiência específica foi calculada individualmente para cada gene. Para cada gene de referência e de estudo foram feitas 6 leituras, correspondentes a uma série sucessiva de diluições numa razão de 1:10 de uma pool com os cDNAs em estudo, e respetivas réplicas técnicas. Com os valores de  $C_t$  obtidos, construiu-se uma curva padrão. Segundo o modelo de regressão linear, obteve-se a reta padrão e respetivo declive. Segundo a equação  $E = [10^{(-1/\text{declive})}] - 1$ , obtém-se a eficiência específica para cada gene.

### **2.5.4 – Seleção dos genes de referência**

Os primers desenhados para cada um dos 7 genes candidatos a genes de referência (tab.3) foram testados com um PCR descrito em 2.4.1.1. Para a seleção dos primers de referência procedeu-se a um qRT-PCR, tendo sido mantidas as condições descritas em 2.5.2. Para cada uma das espécies foram preparadas 2 placas para testar os 7 pares de primers para as amostras em estudo (3 réplicas biológicas x 5 tempos), a partir do qual foi determinado o valor de  $C_t$  para cada amostra. Esta informação foi importada para o software Genex versão 4.3.7 (MultiD Analyses AB, EUA) para ser tratada com o Normfinder e GeNorm. O NormFinder determina o número ideal de genes de referência a usar, enquanto o GeNorm determina a estabilidade dos genes de referência (M), por comparação dos vários pares de genes candidatos possíveis, para cada uma das condições experimentais. Neste caso, as condições em estudo são os 5 tempos em que foi recolhido o material inoculado, sendo que o esperado é que a variabilidade da expressão dos genes seja muito pouca nas diferentes situações. Através desta ferramenta, o valor de  $C_t$  é convertido num valor de M, que reflete o grau de estabilidade dos genes de referência. Quanto menor o valor de M, mais estável é a expressão dos genes de referência nas diferentes condições.

### 2.5.5.- Quantificação relativa da Expressão

Para cada um dos genótipos testados foi feita uma quantificação dos genes em estudo em relação à expressão dos genes de referência determinados. Com recurso ao software Genex, os valores de  $C_t$  obtidos foram pré-processados para:

- a) Correção da eficiência específica – partindo dos valores obtidos anteriormente, das eficiências, para cada um dos genes (1 de referência e 1 de estudo) é possível corrigir a eficiência específica segundo a equação  $C_{TE=100\%} = C_{TE} \cdot ((\log(1+E))/(\log(2)))$
- b) Normalização das reações de qPCR – a cada uma das amostras é atribuído um valor de  $C_t$  que corresponde à média aritmética das 2 réplicas técnicas.
- c) Normalização com os genes de referência – Os valores de  $C_t$  obtidos para cada gene de estudo ( $C_{t\ GE}$ ) tornam-se relativos ao valor de  $C_t$  das várias amostras obtidos para os genes de referência ( $C_{t\ GR}$ ). Assim, ao valor de cada amostra para o gene em estudo, é subtraída a média dos valores de  $C_t$  dos genes de referência para as respetivas amostras, segundo a equação  $C_{t\ GE} = C_{t\ GE} - (1/\eta) \sum_{t=1}^{\eta} C_{t\ GR}$ ;
- d) Atribuição de quantidade relativa, relativamente ao controlo – relaciona a expressão do gene em cada amostra com a expressão basal existente no controlo.

### 3- Resultados

#### 3.1 - Contagem e identificação de *Bursaphelenchus xylophilus*

O número de indivíduos encontrados em ambas as espécies não foi significativo. Na tabela 4 e 5, apresentam-se os resultados obtidos da contagem dos nemátodes nas diferentes réplicas e nos diferentes tempos estabelecidos.

**Tabela 4-** Contagem de nemátodes nas diferentes réplicas e nos diferentes tempos, para *Pinus pinaster*\*

Tempo estabelecido	Amostras	Nemátodes extraídos do tecido	Nemátodes extraídos da amostra biológica
T1	Pp2A	109	0
	Pp2B	61	0
	Pp3A	249	0
	Pp3B	162	0
T2	Pp4A	316	2
	Pp4B	214	0
T3	Pp5	12	3
	Pp7A	5	2
	Pp7B	26	8
	Pp9	29	3
T4	Pp10A	0	0
	Pp10B	1	4
T5	Pp11B	1	1
	Pp12A	1	1
	Pp12B	0	2

\*T1= 6h; T2= 24h; T3= 48h; T4= 7dias; T5= 8dias

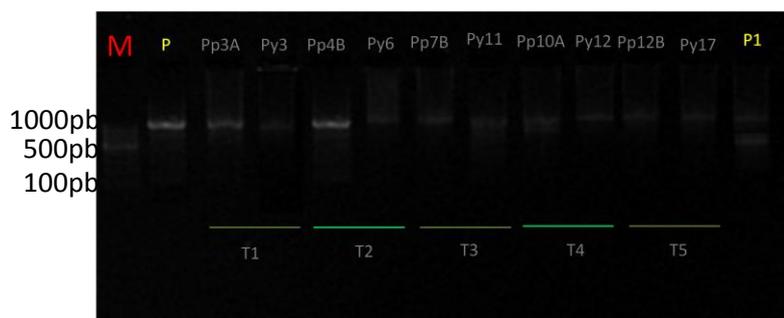
**Tabela 5 -** Contagem de nemátodes nas diferentes réplicas e nos diferentes tempos, para *Pinus yunnanensis*\*

Tempo estabelecido	Amostras	Nemátodes extraídos do tecido	Nemátodes extraídos da amostra biológica
T1	Py3	312	0
	Py4	321	0
	Py5	450	0
T2	Py6	257	0
	Py7	522	5
	Py8	216	1
T3	Py9	75	76
	Py10	48	8
	Py11	66	3
T4	Py12	6	7
	Py13	7	0
	Py14	6	4
T5	Py15	15	15
	Py16	8	8
	Py17	6	6

\*T1= 6h; T2= 24h; T3= 48h; T4= 7dias; T5= 8dias

Como se pode verificar grande parte dos nemátodes ficaram retidos na gaze. O número de nemátodes mais elevado foi recolhido na amostra Py9 para o T3. No caso do pinheiro bravo, o número mais elevado de nemátodes foi obtido para a amostra Pp7B para o T3.

Foi ainda utilizada a técnica de confirmação molecular do nemátode nas amostras inoculadas, por Polymerase Chain Reaction (PCR) utilizando o método de Zhuo, k. *et al* (2011), tendo sido obtida amplificação para *Bursaphelenchus xylophilus*, nas amostras biológicas, o que prova que as plantas foram inoculadas com sucesso. O número reduzido de nemátodes obtido na contagem pode ter a ver com o método de extração utilizado. Como se pode verificar na figura 8, obteve-se um produto de amplificação de 1000bp em 10 amostras inoculadas, o que indica que há presença de nemátode, no entanto a banda de 100bp específica para *Bursaphelenchus xylophilus* é muito ténue ou não é visualizada. Contudo, comparando com o controlo positivo para *Bursaphelenchus mucrunatus*, e uma vez que ambas as espécies foram inoculadas com *Bursaphelenchus xylophilus*, podemos afirmar que o nemátode presente nas plantas correspondente a *Bursaphelenchus xylophilus*.

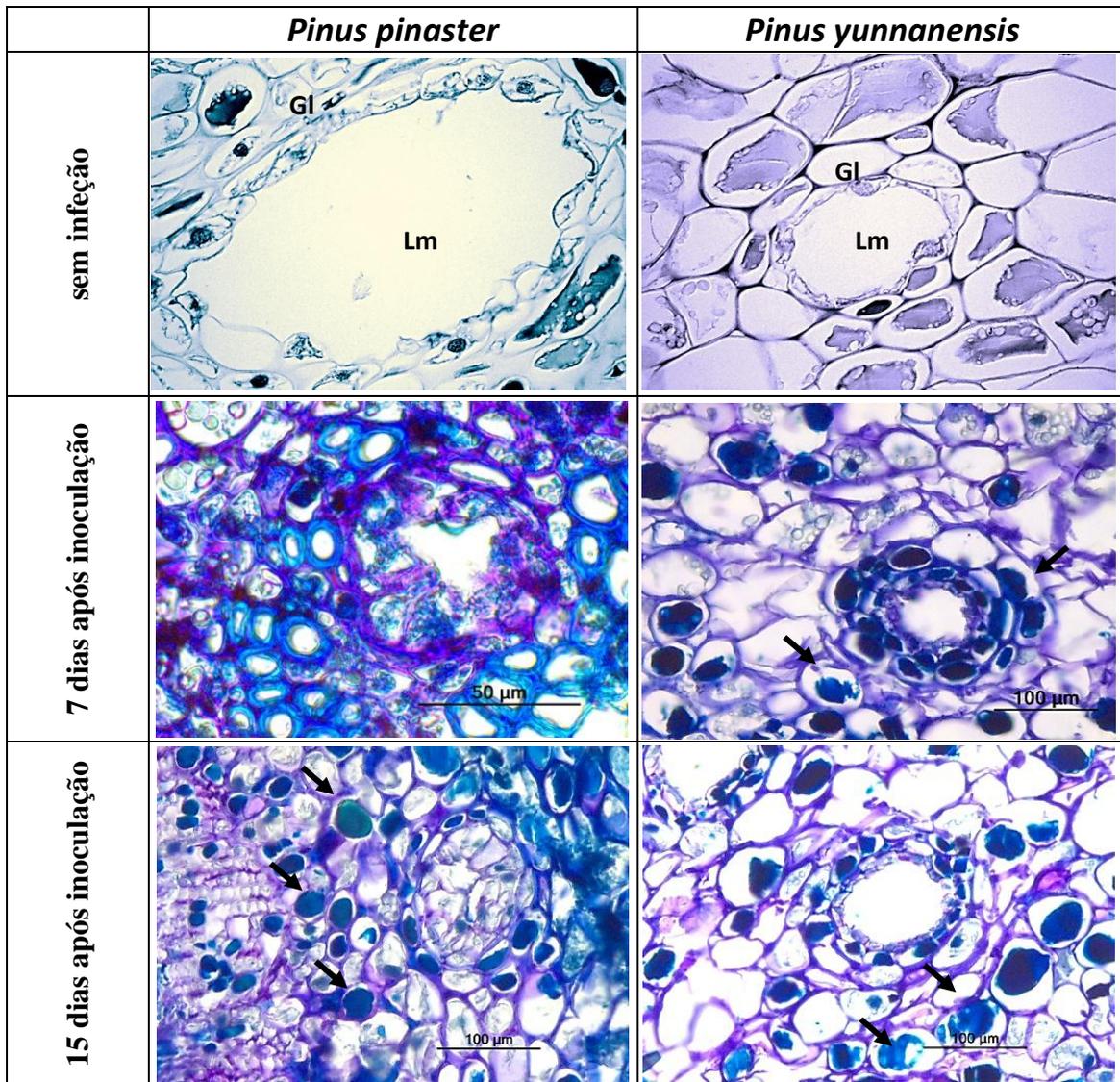


**Figura 8-** Amplificação para *Bursaphelenchus xylophilus* em 10 amostras inoculadas. **P-** controlo positivo para *Bursaphelenchus xylophilus*; **P1-** controlo positivo para *Bursaphelenchus mucrunatus*; **M-** marcador 1000pb DNA ruler

### 3.1.1- Observações histológicas

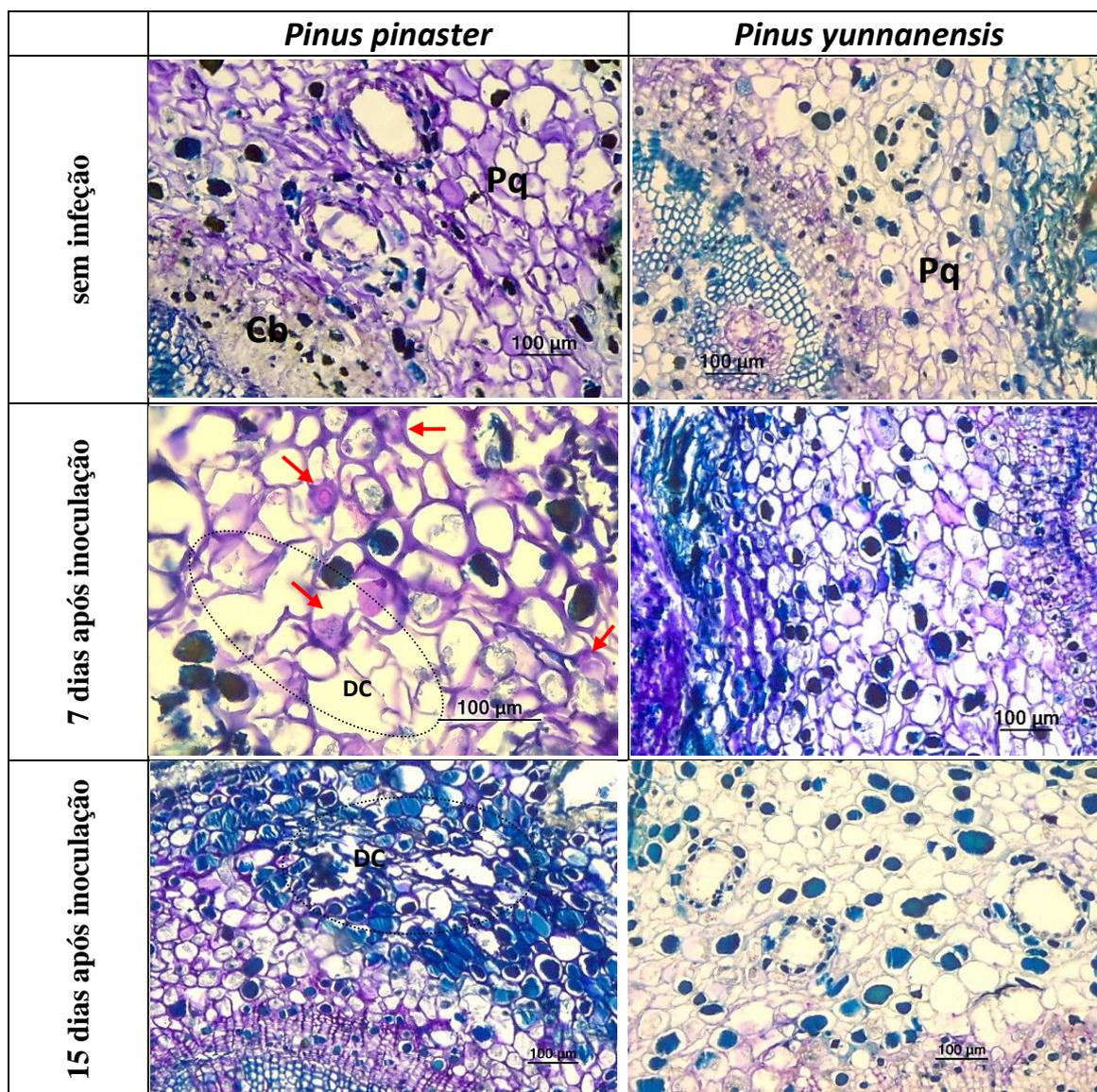
Neste trabalho foram feitos cortes histológicos, com o objetivo de observar o tipo de lesão após infeção, nos tempos 7 dias e 15 dias, em comparação com tecidos não infetados. Antes da inoculação, ou seja no tempo 0, existem diferenças que importa salientar; as plantas de *P. pinaster* apresentam canais de resina no córtex com dimensões consideravelmente superiores aos de *P. yunnanensis* (fig.9).

## Canais de Resina no Córtex



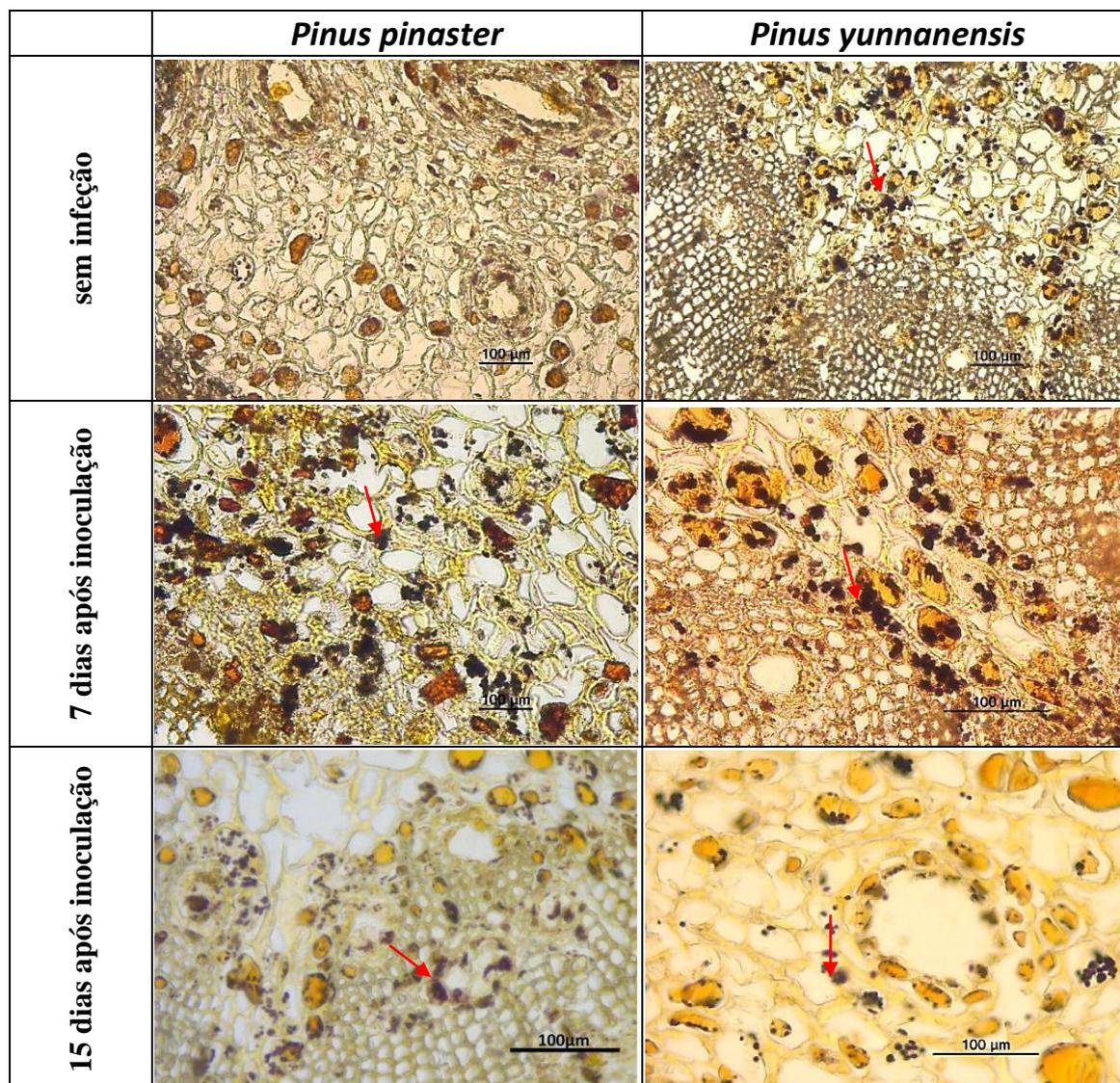
**Figura 9** - Secções transversais dos canais de resina do córtex de *Pinus pinaster* e *Pinus yunnanensis* sem infecção, 7 dias e 15 dias após inoculação, coradas com azul de toluidina Sendo, **Gl**- células glandulares; **Lm** – lúmen; as setas a preto representam idioblastos taníniferos

## Células do parênquima



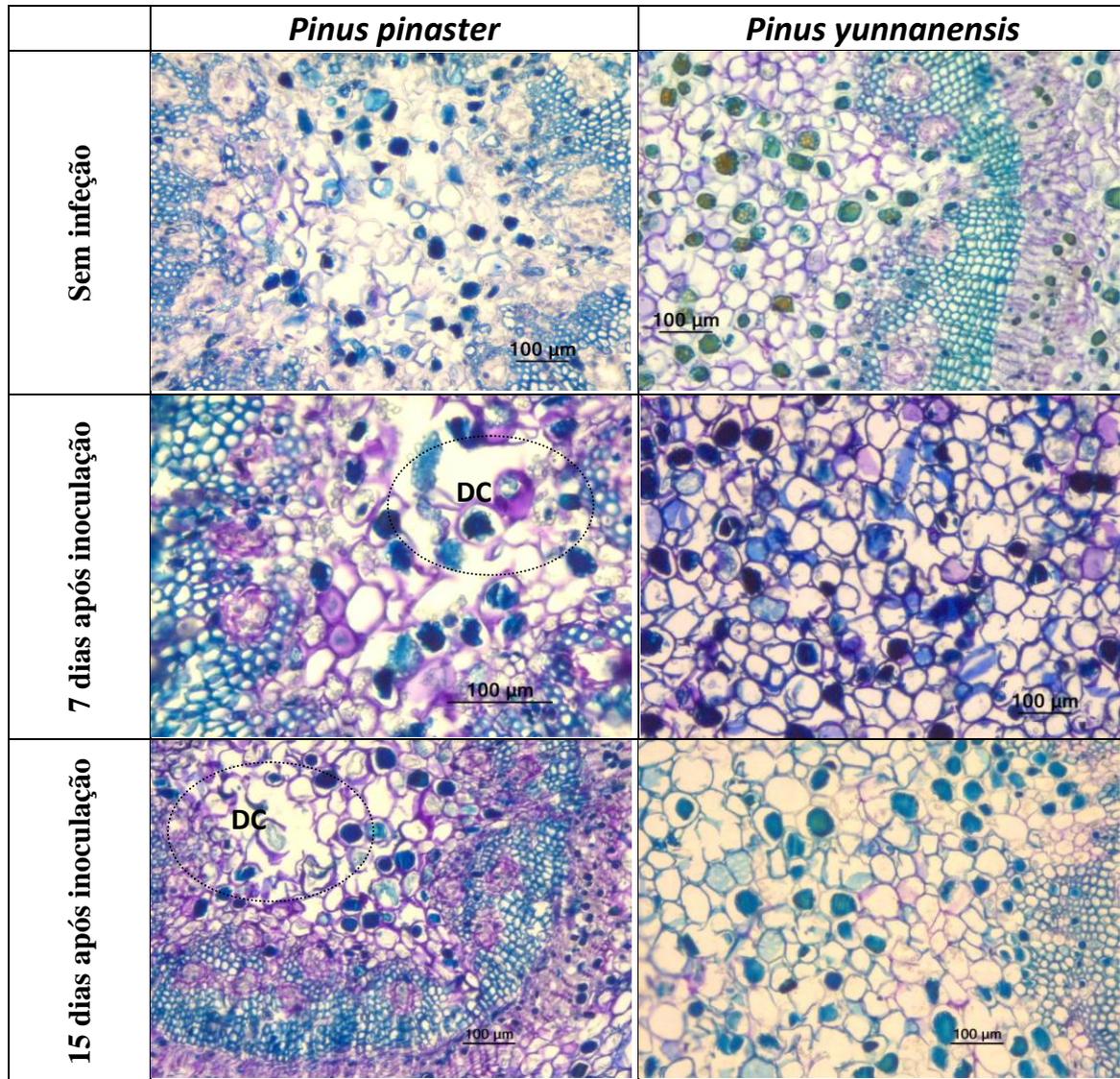
**Figura 10** – Secções transversais da zona de parênquima de *Pinus pinaster* e *Pinus yunnanensis* sem infecção, 7 dias e 15 dias após inoculação, corados com azul de toluidina. Sendo, **DC** – desorganização; celular; **Pq** – Parênquima ; **Cb** – Câmbio e as setas a encarnado, assinalam nemátodes.

## Inclusões de amido nos diferentes tecidos, em ambas as espécies



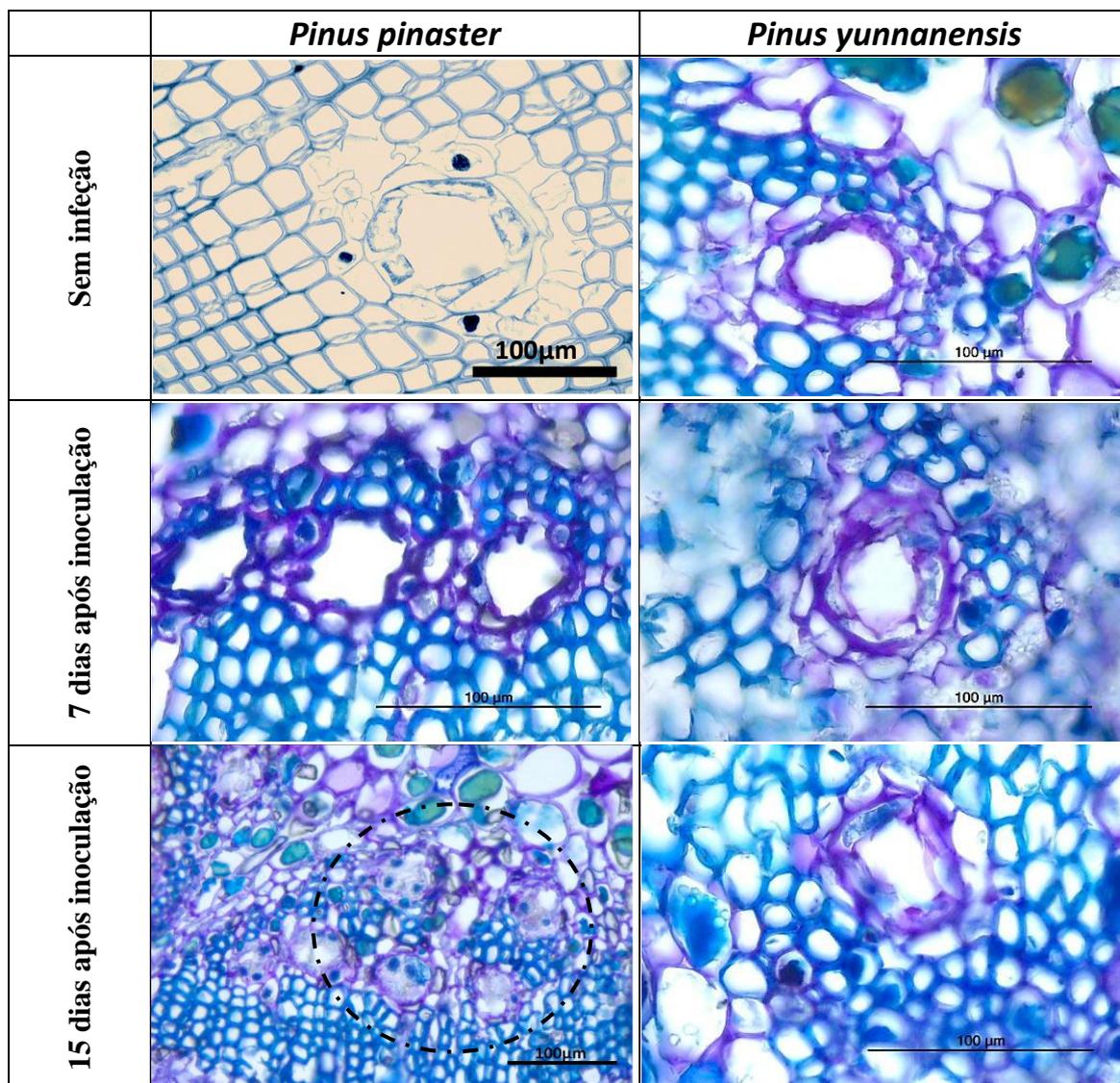
**Figura 11** – Secções transversais de diferentes tecidos de *Pinus pinaster* e *Pinus yunnanensis* sem infecção, 7 dias e 15 dias após inoculação, corados com Lugol. Sendo, As setas a encarnado, assinalam inclusões de amido.

## Células da medula

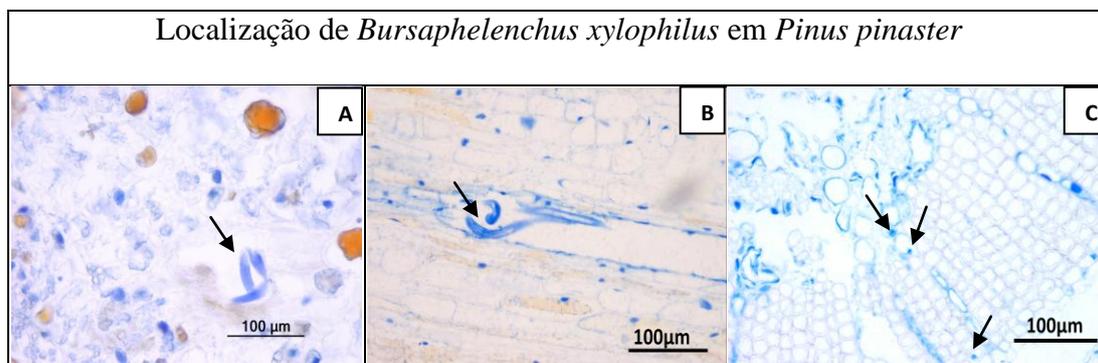


**Figura 12** – Secções transversais da zona da medula de *Pinus pinaster* e *Pinus yunnanensis* sem infecção, 7 dias e 15 dias após inoculação, corados com azul de toluidina. Sendo, **DC** – desorganização celular.

## Canais de resina do xilema



**Figura 13** – Secções transversais da zona do xilema de *Pinus pinaster* e *Pinus yunnanensis* sem infecção, 7 dias e 15 dias após inoculação, corados com azul de toluidina.



**Figura 14** – Localização do nemátode nos tecidos de *Pinus pinaster* ao fim de 15 dias de infecção. **A:** Corte transversal - canal de resina do córtex; **B:** Corte longitudinal – Canal de resina do córtex; **C:** Corte transversal – medula. As setas a preto representam o nemátode.

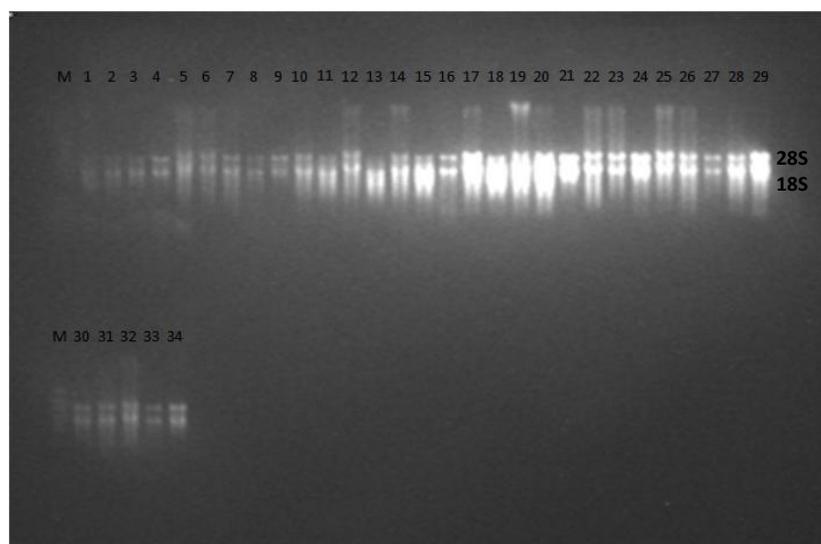
Pode observar-se na Fig. 9 um canal de resina de *P. pinaster* de secção elíptica com um eixo maior de cerca de 150µm e eixo menor de 75µm. Em contrapartida o canal de resina de *P. yunnanensis* (Fig. 9) mede cerca de 50 µm (eixo maior) por 30 µm (eixo menor). Além desta diferença é também de referir que as plantas de *P. yunnanensis* apresentavam, com a coloração de Lugol, uma maior marcação destas inclusões (Fig. 11). Quanto a diferenças de células de parênquima e medula, não existem diferenças a salientar (Fig 10 e 12). Ao fim de 7 dias de infecção observou-se uma degradação das células epiteliais dos canais de resina do córtex em *P. pinaster* (Fig. 9) em comparação com as mesmas células de *P. yunnanensis* (Fig. 9). No entanto em *P. yunnanensis* é notória a presença de idioblastos taniníferos nas células circundantes do canal de resina. Nesta fase começa a ser assinalável a desorganização celular do parênquima em *P. pinaster*, em comparação com o *P. yunnanensis* (Fig. 10). Ao fim de 7 dias após a inoculação, é já possível observarem-se nemátodes no parênquima de *P. pinaster* (Fig. 10), setas encarnadas. Quanto às inclusões de amido, estas passaram também a surgir em *P. pinaster* (Fig. 11), sendo que as de *P. yunnanensis* se mantiveram (Fig. 11). Os canais do xilema não sofreram qualquer tipo de alteração nas duas espécies (Fig.13).

Ao fim de 15 dias de infecção, apesar de a extração de nemátodes apresentar um número reduzido em *P. pinaster* (7nem/3plantas) e em *P. yunnanensis* (12nem/3plantas), foi possível detetar através de cortes histológicos, nemátodes nas amostras de *P. pinaster* o que não ocorreu em *P. yunnanensis*. Na Fig. 14, observaram-se nemátodes, nos canais de resina do córtex, câmbio e na medula. Quanto à presença de idioblastos taniníferos, apresenta-se mais acentuada em ambas as espécies, comparativamente aos 7 dias (Fig. 9). Relativamente às inclusões de amido, estas tornam-se mais localizadas junto aos canais de resina, em ambas as espécies, em *P. pinaster*, junto aos canais de resina do xilema, enquanto em *P. yunnanensis* junto aos canais de resina do córtex (Fig. 11). Os

danos da medula não sofreram alterações (Fig. 12). Nos canais de resina do xilema de *P. pinaster*, observaram-se danos significativos (Fig. 13), enquanto que em *P. yunnanensis* este permanecem sem qualquer tipo de dano (Fig.13).

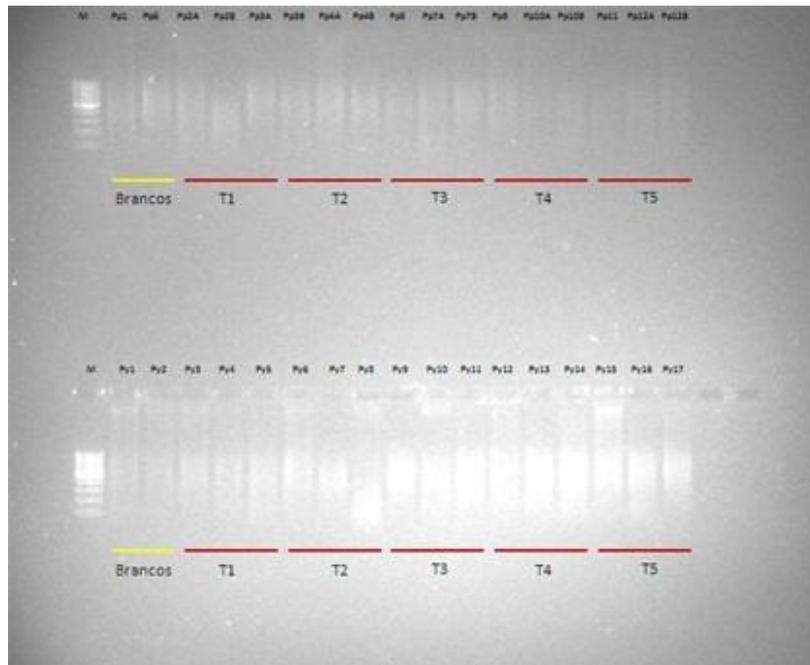
### 3.2 – Extração de RNA e síntese de cDNA

Após os estudos de histologia, que confirmaram a presença de nemátodes nas plantas de estudo, resultados estes também corroborados pelos métodos moleculares, procedeu-se à extração de RNA para ulterior síntese de cDNA. Na figura 15 está representado o RNA total obtido para as 34 plantas,



**Figura 15** – RNA total de 34 plantas. Cada amostra apresenta duas bandas bem definidas correspondentes às sub-unidades 28S e 18S. **1 a 8** – corresponde ao T1; **9 a 14** – T2; **15 a 20** – T3; **21 a 28** – T4 e por último **29 a 34** – T5 de *Pinus pinaster* e *Pinus yunnanensis*;

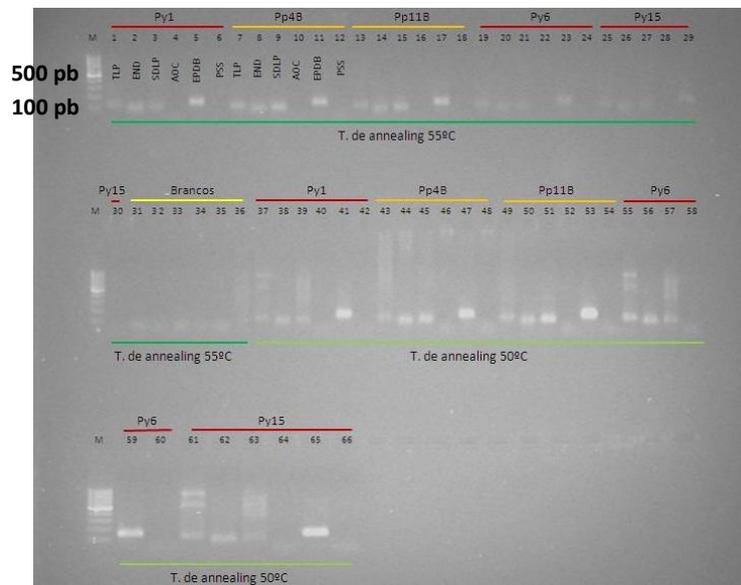
que, como se pode observar, apresenta integridade e qualidade, apresentando duas bandas bem definidas 28S e 18S. A quantificação de RNA total está descrito em **2.3.3**. Na figura 16 encontram-se as bibliotecas de cDNA sintetizadas com oligo dT. O resultado esperado é um smear, dada à quantidade de fragmentos presentes no cDNA.



**Figura 16** – Bibliotecas de cDNA sintetizadas com oligo (dT); T1, T2, T3, T4 e T5 correspondem aos tempos estabelecidos.

### 3.3 – Amplificação dos genes de estudo

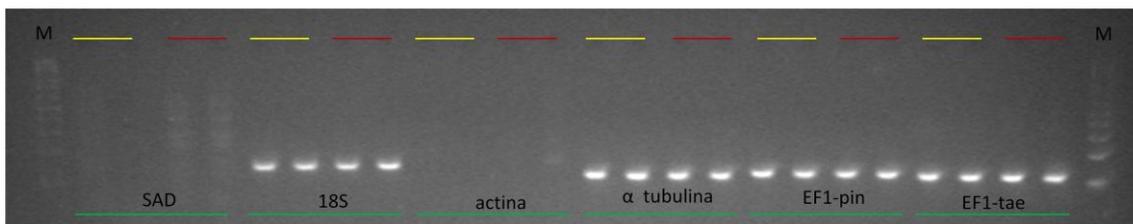
Para cada gene de estudo, utilizou-se um par de primers desenhado com homologia para o género *Pinus*. Os produtos de PCR reportam uma banda bem definida com um tamanho de aproximadamente 150 pb.



**Figura 17** – Amplificação dos genes de estudo e do gene de referência EPDB. Foram testadas 2 temperaturas de annealing 50°C e 55°C. Como amostras utilizou-se um branco e duas amostras de estudo, de cada espécie *Pinus pinaster* (amarelo) e *Pinus yunnanensis* (vermelho). Gel a 1% com marcador de 1000bp.

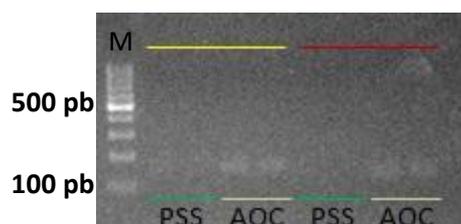
Para uma melhor especificidade no emparelhamento dos primers, utilizaram-se duas temperaturas de annealing, respetivamente, 50°C e 55°C e como se pode verificar na figura 17, a melhor temperatura de annealing é 55°C para a qual se obteve uma banda específica para os 3 genes de estudo e para o gene de referência EPDB.

Seguidamente também foi obtida amplificação para os restantes genes de referência (figura 18), sendo o protocolo de amplificação utilizado igual ao anterior, no entanto para estes genes utilizou-se uma temperatura de annealing de 60°C.



**Figura 18** – Amplificação dos genes de referência. A amarelo estão representadas a espécie *Pinus pinaster* e a vermelho a espécie *Pinus yunnanensis*. Gel a 2% com marcador de 100 bp.

Na primeira reação de amplificação, efetuada para os genes que codificam para a AOC e PSS, não se obteve amplificação, assim sendo, otimizou-se a temperatura de annealing para 60°C para a qual se obteve um produto de PCR com uma banda específica de 150 pb (figura 19).



**Figura 19** – Amplificação dos genes de estudo. A amarelo está representada a espécie *Pinus pinaster* e a vermelho a espécie *Pinus yunnanensis*. Temperatura de annealing 60°C. Presença de uma banda específica nos 150pb para AOC e ausência de amplificação para PSS em ambas as espécies. Gel a 1% com marcador de 1000 bp.

### 3.4 – Determinação da Eficiência da amplificação específica

A técnica de Reverse Transcritase Polymerase Chain Reaction RT-PCR é uma técnica recorrente para a quantificação do mRNA em amostras biológicas. Uma das grandes vantagens desta técnica é que permite quantificar genes com expressão reduzida. No entanto, a variabilidade na eficiência do PCR, poderá ser um problema. Assim sendo, para minimizar a variabilidade induzida pelo PCR, foi calculada individualmente para

cada gene a eficiência específica, descrita em 2.5.3. Na tabela 9 encontram-se as eficiências determinadas para cada gene de estudo e para cada gene de referência, obtendo-se eficiências perto dos 100% com um  $r^2$  de 0,99. Uma vez que não se obteve amplificação para a Actina e para o SAD não se fez a análise destes dois genes. O EF1-tae também foi outro gene que não se incluiu no estudo, porque os resultados em qRT-PCR não foram obtidos com sucesso e como se tratava de um Elongation factor, tal como EF1-pin e EPDB, não se continuou com o estudo. Assim, para genes de referência temos o EF1-pin, EPDB,  $\alpha$  tubulina e 18S.

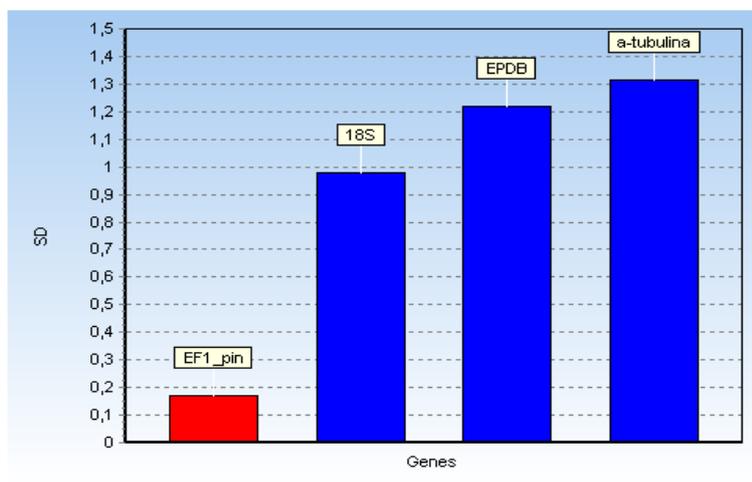
**Tabela 9-** Eficiência da amplificação específica para os genes de referência e de estudo a usar no qRT-PCR

<b>Genes</b>	<b>Eficiência %</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b><math>\alpha</math> tubulina</b>	100	0,99
<b>18S</b>	96	0,99
<b>EF1-pin</b>	101	0,99
<b>EPDB</b>	99	0,99
<b>TLP</b>	103	0,99
<b>END</b>	104	0,99
<b>SDLP</b>	99	0,99
<b>AOC</b>	102	0,99
<b>PSS</b>	97	0,99

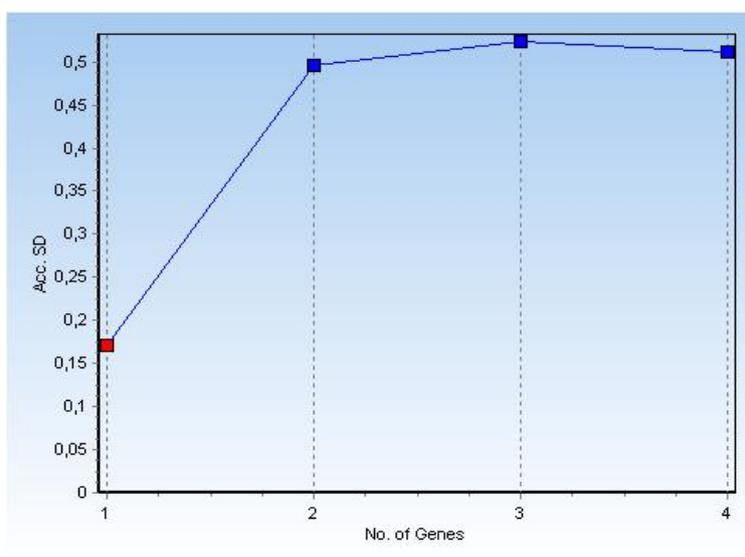
### 3.5 – Seleção dos genes de Referência

Muitos são os erros que podem influenciar a quantificação de mRNA por qRT-PCR, tais como quantidade de amostra inicial, as diferenças das eficiências a variação da integridade do RNA. Assim, de modo a combater esses erros, e para aumentar a fiabilidade da quantificação, para além da existência de controlos no ensaio, a escolha dos genes de referência são também de muita importância. Os genes de referência são genes que podem ser constitutivos da planta, em que a variabilidade destes em diferentes tecidos e condições é quase nula. Estes foram determinados individualmente para cada espécie, com o auxílio dos logaritmos Normfinder e GeNorm. O primeiro logaritmo aconselhou o uso de 2 genes de referência EPDB e EF1-pin com um desvio padrão (DB) de 0,3256 para a espécie *Pinus pinaster* após vários tratamentos: ignorando grupos e tendo em conta os grupos (inter-grupos e intra-grupos). Enquanto que para *Pinus yunnanensis*, utilizando a mesma metodologia, aconselhou o uso de 2 genes de

referência EF1-pin e 18S com DB de 0,2957. Uma outra tentativa foi ter em conta as duas espécies, em que pelo Normfinder, foi aconselhado o uso de um gene de referência EF1-pin com um DB de 0,1718. O GeNorm apoiava os resultados obtidos pelo Normfinder, selecionando-se como gene de referência para ambas as espécies o EF1-pin (figura 20 e 21).



**Figura 20** – Gráfico dos valores de SD – Desvio padrão dos vários candidatos a genes de referência, para ambas as espécies. A vermelho está representado o melhor gene de referência, com um menor valor de SD.

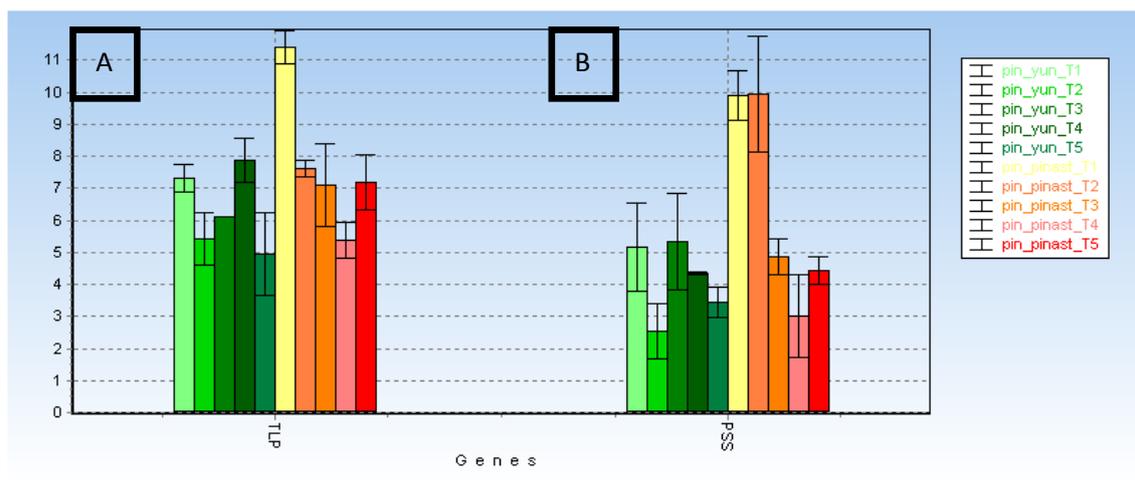


**Figura 21** – Gráfico dos valores de SD acumulados. Está representado o número de genes aconselhado para ambas as espécies. A vermelho está representado o melhor número de genes de referência, neste caso apenas um, com um menor valor de SD acumulados.

### 3.6 – Quantificação Relativa dos genes de estudo

Para cada uma das espécies foi analisado o padrão temporal nos diferentes tempos estabelecidos. A quantificação da expressão dos genes de estudo foi relativa em comparação com a expressão dos mesmos no controlo (incisão com água e colheita às 6horas), tornando-se este, como expressão basal em ambas as espécies.

Para a espécie *Pinus yunnanensis*, e no que diz respeito à expressão do gene TLP nas plantas de estudo, em relação ao controlo, existe uma expressão média 6 vezes superior em todos os tempos. Contudo, entre os tempos 6h e 24h há um decréscimo da expressão, seguida de um aumento até aos sete dias, havendo novamente um decréscimo aos 15 dias figura 22A. Quanto ao gene PSS, a expressão é relativamente mais baixa, no entanto, ainda continua a ser uma expressão significativa sendo 3 vezes superior ao controlo. Em relação ao comportamento da expressão nos diferentes tempos, em comparação com o gene TLP, existe sempre uma diminuição às 24h e um aumento aos 7 dias, sendo que para os 15 dias continua haver uma diminuição de ambas as expressões, figura 22B.

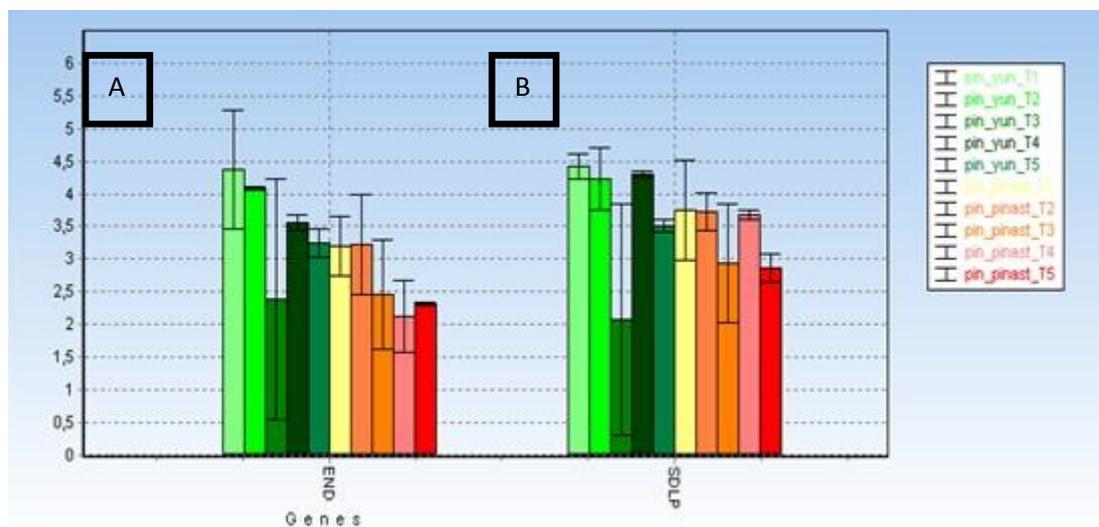


**Figura 22** – Quantificação da expressão génica de TLP (A) e PSS (B), em *Pinus yunnanensis* (verdes) e *Pinus pinaster* (vermelhos) nos tempos T1, T2, T3, T4 e T5. A quantificação foi feita relativamente ao controlo, estando representada em expressão linear. Os desvios padrão resultam de 2 réplicas biológicas e 2 réplicas técnicas.

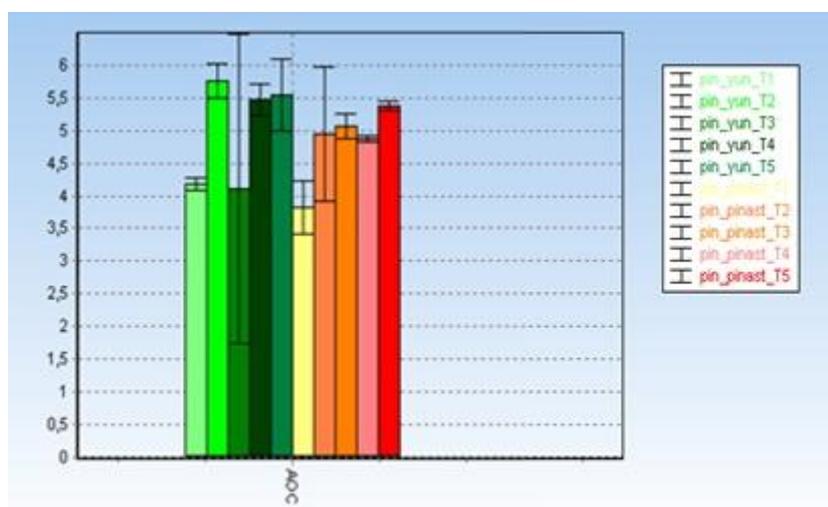
Em relação à expressão de TLP e PSS em *Pinus pinaster*, figura 22 A e B, a expressão é mais alta, relativamente à expressão de *P yunnanensis*, com uma média de 8 vezes e 6 vezes, respetivamente superior, relativamente ao controlo.

O gene END (figura 23A) tem uma expressão contínua ao longo dos 5 tempos, sendo em média 4 vezes superior ao controlo. Ao contrário dos outros genes, aos 15 dias a expressão ainda se mantém constante. A expressão de SDLP (figura 23B) mantém o

mesmo padrão de expressão do gene END. Em relação ao *Pinus pinaster*, e para o gene END (figura 23A) a expressão, embora 3 vezes superior ao controlo, tende a diminuir ao longo dos 5 tempos, passando-se o mesmo quanto à expressão de SDLP (figura 23B).



**Figura 23** – Quantificação da expressão génica de END (A) e SDLP (B) em *Pinus yunnanensis* (verdes) e *Pinus pinaster* (vermelhos) nos tempos T1, T2, T3, T4 e T5. A quantificação foi feita relativamente ao controlo, estando representada em expressão linear. Os desvios padrão resultam de 2 réplicas biológicas e 2 réplicas técnicas.



**Figura 24** – Quantificação da expressão génica de AOC, em *Pinus yunnanensis* (verdes) e *Pinus pinaster* (vermelhos) nos tempos T1, T2, T3, T4 e T5. A quantificação foi feita relativamente ao controlo, estando representada expressão linear. Os desvios padrão resultam de 2 réplicas biológicas e 2 réplicas técnicas.

No caso da expressão de AOC, em *Pinus yunnanensis*, a expressão é mais alta inicialmente tendo tendência a subir, ao longo do tempo, sendo esta em média 5 vezes

superior ao controlo. Em *Pinus pinaster*, a expressão de AOC é ligeiramente mais baixa, mas semelhante ao *Pinus yunnanensis* (figura 24).

## 4- Discussão

### 4.1 – Histopatologia

A progressão da doença da marchidão dos pinheiros é geralmente descrita em duas fases principais: uma fase inicial em que não há sintomatologia externa, e uma fase mais avançada em que as agulhas dos pinheiros ficam amarelas. Seguindo este princípio, por observação histológica, tentou-se perceber quais os danos existentes 7 dias e 15 dias após inoculação. Para tal, inicialmente analisaram-se amostras sem infeção, de ambas as espécies, *Pinus pinaster* e *Pinus yunnanensis*. Como se pode verificar nos resultados obtidos em 3.1.1. figura 9, o lúmen dos canais de resina do córtex está delimitado por duas camadas de células glandulares. É nestas células, ricas em citoplasma, que rodeia o lúmen (células epiteliais), que ocorre a biossíntese de compostos terpénicos constituintes da resina (GLEIZES *et al*, 2006). É também evidente, que as células do parênquima, assim como a medula, estão bem preservadas, não havendo sinais de degenerescência celular, no entanto, a presença de amido é notoriamente bem diferente na espécie *Pinus pinaster* quando comparada com *Pinus yunnanensis*. Após uma semana de infeção, em *Pinus pinaster*, já é notória a degradação dos canais de resina do córtex, das células do parênquima cortical e das células parenquimatosas dos raios do xilema. Quanto aos canais de resina do xilema, a degradação não é tão acentuada. Segundo Son *et al*. 2009, às 24horas o nemátode já se encontra disperso pelo parênquima cortical e câmbio e como se pode observar na Fig.10 e 14, os nemátodes localizam-se tanto nos canais do córtex, como no câmbio e medula. Após 15 dias de infeção, observam-se cavidades irregulares no córtex, degradação dos canais de resina e degradação das células da medula. Entre as células parenquimatosas, há evidência de idioblastos taniníferos, mostrando que houve ativação de mecanismos de defesa da planta, nomeadamente produção de metabolitos secundários, tais como fenóis. Em relação à presença de amido, observa-se um aumento significativo ao longo do tempo, concentrando-se maioritariamente, nas células dos canais de resina do xilema. Hofmann e Grundler, (2008) e Almeida Engler, (2004), que realizaram alguns estudos com outras espécies de nemátodes, defendem que as inclusões de amido só aparecem 24horas após a infeção. Neste caso não é possível confirmar a curto prazo este mecanismo, no entanto em *P. pinaster*, confirma-se a presença destas inclusões aos 7 dias após infeção, tal como verificado nas Fig. 11. Também é importante salientar o facto de estes autores

considerarem o amido como um carboidrato essencial de armazenamento a longo e curto prazo, para suposto alimento do nemátode. Segundo as nossas observações, há uma correlação entre a taxa de crescimento do nemátode e a quantidade de amido, ou seja, na presença de nemátode são observáveis inúmeras inclusões de amido. Além de se ter verificado a presença de nemátode em diferentes tecidos em *P. pinaster*, conjugando com a localização do amido, podemos sugerir que aos quinze dias após infecção, o nemátode localiza-se essencialmente nas células epiteliais circundantes dos canais de resina do xilema.

Em *P. yunnanensis* a presença de amido foi detetada desde o tempo 0. No entanto aos 15 dias, foi notória uma redistribuição espacial do mesmo, ou seja, concentrou-se essencialmente nas células epiteliais, que circundam os canais de resina do córtex, podendo sugerir a presença de nemátodes nestas estruturas.

Assim, em *P. pinaster*, tendo em conta os resultados obtidos: o tipo de lesões observadas, a formação e localização de amido e a presença de *Bursaphelenchus xylophilus* nos cortes histológicos, sugerem uma progressão rápida (ao fim de 15 dias) até aos tecidos da medula. Em *P. yunnanensis*, não são notórias as diferenças da quantidade de amido, ao longo do tempo, assim como não são observados qualquer tipo de danos nos tecidos. No entanto, a redistribuição do amido, pode fazer supor que os nemátodes possam encontrar-se ainda numa zona mais periférica do caule, nos canais de resina do córtex.

Estes resultados parecem estar em contradição com número obtido através da contagem de nemátodes, uma vez que ao fim de 15 dias era superior o número de nemátodes em *P. yunnanensis* do que em *P. pinaster*. Esta contradição pode ser explicada pela diferente localização das amostras colhidas para cada uma das técnicas (histologia/contagem de nemátodes), assim como pelo fato de a técnica de extração de nemátodes não ser 100% eficaz.

Embora se tenha verificado infecção nas plantas, o número de nemátodes poderia ter sido superior. No entanto, uma resposta hipersensitiva da planta no local de inoculação poderá dificultar a entrada dos nemátodes no interior da planta, uma vez que se dá a necrose dos tecidos no local da ferida.

## 4.2 – Expressão dos genes de estudo

Como foi anteriormente referido na seção resultados, apresentado em 3.6., nenhum gene revelou uma expressão significativamente superior na espécie tolerante *P. yunnanensis* em relação à da espécie susceptível *P. pinaster*. A expressão diferencial dos genes de estudo é referida por vários autores como ativa perante respostas ao stress biótico e abiótico. Esta expressão foi quantificada relativamente ao controlo, para se poder saber qual a expressão referente ao stress provocado por *Bursaphelenchus xylophilus*.

O gene *thaumatin like protein (tlp)*, que pertence à família das PRs, apresentou na espécie *P. pinaster* 6h após infeção, uma expressão diferencial 11 vezes superior à expressão quantificada no controlo. No entanto, em *P.yunnanensis* espécie tolerante, este gene embora sobre-expresso, não apresentou valores superiores aos de *P. pinaster*. Segundo Baldo *et al*, (2010), a ativação de genes que codificam para as PRs ocorre poucas horas após infeção, como se pôde verificar nos resultados obtidos. Estudos recentes foram efetuados de forma a quantificar a expressão de *tlp* em outras espécies, em resposta a outros patógenos, tendo-se apresentado como sobre-expresso, considerando-o assim, um gene candidato à resistência (Liu *et al.*, 2010).

O gene *pinosylvin synthase*, apresentou uma elevada expressão diferencial não só nas primeiras horas após infeção, bem como uma expressão mais acentuada em *P. pinaster* do que em *P.yunnanensis*. Esta diferença pode ser justificada pelo facto, de o Pinosylvin ser um estilbeno que se localiza nas células do cerne de *Pinus*, ou seja, se as células que contêm os estilbenos, não forem destruídas, não há uma elevada expressão de *pinosylvin synthase* (Kuroda & Kuroda, 2002). Como se pôde verificar através das observações histológicas, *Bursaphelenchus xylophilus*, em *P. pinaster* tem uma progressão mais rápida do que a observada em *P. yunnanensis*, podendo justificar a elevada expressão diferencial de *pss* em *Pinus pinaster*

Relativamente à expressão diferencial do gene *end*, verifica-se uma expressão mais elevada nos primeiros tempos em *P.yunnanensis*. As endo-quitinases hidrolisam as ligações 1,4- $\beta$  da quitina (Veronico *et al.*, 2001), estando esta presente em *Bursaphelenchus xylophilus*.

Neste estudo, a expressão diferencial de *superoxide dismutase like protein* apresentou-se contínua nos diferentes tempos de estudo. A Superoxide Dismutase é uma enzima que catalisa a dismutação do superóxido em oxigénio e peróxido de hidrogénio, sendo este último indutor da formação de lenhina, fazendo com que as paredes celulares fiquem mais resistentes. Segundo Shin *et al.*,(2009), após 7 dias de infeção, a expressão diferencial de *sdlp* é mais notória do que às 24h em *P. densiflora*, espécie tolerante ao

nemátode. Observações estas que contrariam os resultados obtidos. Tal facto pode ser justificado, uma vez que as plantas se encontram em stress não só biótico mas também em stress abiótico.

Relativamente a *aoc*, é o gene que apresenta uma maior expressão diferencial em relação ao controlo, em ambas as espécies, apresentando uma expressão elevada ao longo do tempo. A Alene Oxyde Cyclase é uma enzima chave na biossíntese do ácido jasmónico (JA). Os jasmonatos podem ser formados tanto pelo ácido jasmónico, como pelo metil-jasmonato, sendo este último indutor de canais de resina traumáticos em coníferas (Miller *et al.*, 2005). Na presença de canais de resina traumáticos (obstruídos) a migração de *B. xylophilus* torna-se mais difícil.

Para ser possível obter conclusões mais robustas teríamos que ter mais réplicas de forma a poder homogeneizar a variabilidade genética existente dentro da mesma espécie, diminuindo assim o desvio padrão, uma vez que as plantas inoculadas são germinantes com 3 anos, tratando-se portanto de génotipos diferentes. Teria sido também interessante ter um controlo sem qualquer tipo de stress, de maneira a perceber se alguma destas plantas possuía alguma expressão basal.

Embora não tenha sido obtida uma expressão diferenciada entre as duas espécies para os genes estudados, selecionados como candidatos à resistência à doença da marchidão do pinheiro, podemos sugerir que os primeiros tempos após a infeção 6h e 24h são os tempos em que há uma maior expressão diferencial dos genes deste estudo, que era o objetivo principal deste trabalho.

### **Após 2 meses de inoculação, árvores que foram deixadas até à morte:**



**Figura 25 – A: *Pinus yunnanensis*; B – *Pinus pinaster*; *Pinus yunnanensis* após dois meses de inoculação não apresenta sintomas visíveis, o mesmo não se verificando em *Pinus pinaster*.**

## **5 – Conclusões e perspectivas futuras**

O trabalho cumpriu os objetivos propostos, nomeadamente: permitiu determinar os tempos relevantes utilizar para a sequenciação ulterior e ainda permitiu comparar o tipo de lesão e alterações anatómicas verificadas em ambas as espécies, após infeção. Como já foi referido, em novos ensaios, deve-se ter em conta um maior número de réplicas, de modo a minimizar a variabilidade genética existente dentro da mesma espécie.

As observações histológicas permitiram confirmar alguns dados existentes na bibliografia sobre os danos causados em ambas as espécies. Verificou-se a presença e localização de amido, sugerindo ser um alimento para *Bursaphelenchus xylophilus*. No entanto, existem autores que defendem que poderá tratar-se de barreira física contra o nemátode. A realização de estudos mais aprofundados nesta área seriam uma mais-valia de forma a compreender a interação que existe entre o nemátode e o amido.

## 6 - Bibliografia

- Aguiar, C.** (2012). Botânica para Ciências Agrárias e do Ambiente Volume II • Reprodução e evolução (Vol. II).
- Abrantes,** (2012). The pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in Madeira Island. *Helminthologia*, 49(2): 96-103.
- AIFF (2010)** - Relatório de Caracterização da Fileira florestal 2010 Associação para a Competitividade da Indústria da Fileira Florestal. 80 Págs.
- AFN (2010)** – Autoridade Florestal. Nacional. Inventário Florestal Nacional : Portugal Continental: IFN5, 2005-2006. Relatório Final. Lisboa, Autoridade Florestal Nacional, 2010
- Agrios, G. N.**(2004) -Plant Pathology. 5. Ed. San Diego, Califórnia: Elsevier Academic Press. 922p.
- Aguiar, A., Almeida, M., & Borralho, N.** (2003). Genetic control of growth, wood density and stem characteristics of *Pinus pinaster* in Portugal. *Silva Lus*, 11(2), 131–13.
- Baldo, A., Norelli, J. L., et al .** (2010). Identification of genes differentially expressed during interaction of resistant and susceptible apple cultivars (*Malus x domestica*) with *Erwinia amylovora*. *BMC plant biology*, 10, 1.
- Boerjan W** (2005) - Biotechnology and the domestication of forest trees *Current Opinion in Biotechnology* 2005, 16:159–166.
- Braasch, H.** (2001) – *Bursaphelenchus* species in conifers in Europe: distribution and morphological relations. *EPPO Bulletin*. 31: 127-142.
- Begon, M.; Harper, J.L. & Townsend, C.R.** (1990) – *Ecology. Individuals, populations and communities*. Blackwell Scientific Publ. 2ª Ed. London. 945 p.
- Bolla, R. I., K, F., & Winter, R. E.** (1987). Carbohydrate Concentration in Pine as Affected by Inoculation with *Bursaphelenchus xylophilus*. *Journal of nematology*, 19(1), 51–7.
- Berryman A. A.** 1986. The European woodwasp in Australia, pp.232-236. In: *Forest Insects: Principles and Practice of Population Management*. Plenum Press, NY.
- Chong, J., Poutaraud, A., & Hugueney, P.** (2009). Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science*, 177(3), 143–155.
- Christensen, A. B.; CHO, B. H.; Næsby, M.; Gregersen, P. L.; Brandt, J.; Madriz-Ordeña, K.; Collinge, D. B.; Thordal-Christensen, H.**(2002) -The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Molecular Plant Pathology*, London, v. 3, n. 3, p. 135-144.
- Cabral, M.T.** (1995) – *Introdução à protecção integrada da floresta*. EFN/ISA. Lisboa.122.
- Chinery, M.** (1986) – *Guide to the insects of Britain and western Europe*. Collins. London. 320p

- Capelo, Jorge; Aguiar, C.** História Holocénica dos Pinus em Portugal: Uma Interpretação Geobotânica.
- Dwinell, L.D.** (1997) – The pinewood nematode: regulation and mitigation. *Ann. Rev. Phytopathol.* 35: 153-166.
- D.G.R.F.** (2003) – PROLUNP. *Plano Estratégico para a Erradicação do nemátodo da Madeira do Pinheiro*. MADRP. Lisboa. 22p
- Dan, Cheng-Lin; Wu, Zhao-Liu** (1991) – Studies on the biomass of *Pinus yunnanensis* forest. *Acta Metallurgica Sinica.* 13(01): 1-3.
- Doença da Murchidão do Pinheiro** <http://www.syngenta.com/country/pt/pt/culturas/Pinhal>
- Eveno E, Collada C, Guevara MA, Leger V, Soto A, et al.** (2008) - Contrasting patterns of selection at *Pinus pinaster* Ait. drought stress candidate genes as revealed by genetic differentiation analyses. *Molecular Biology and Evolution* 25: 417–437.
- Edreva, A.** (2005). Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. *Gen Appl Plant Physiol*, 31, 105–124.
- Engler, A. J., Favery, B., Engler, G., & Abad, P.** (2005). Loss of susceptibility as an alternative for nematode resistance. *Current opinion in biotechnology*, 16(2), 112–7
- Evans, H.F.; McNamara, D.G.; Braasch, H.; Chadoeuf, J. & Magnusson, C.** (1996) - Pest risk analysis (PRA) for the territories of the European union (as PRA area) on *Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors in the genus *Monochamus*. *OEPP Bull.* 26:199-249.
- Fenoll Carmen; Grundler, F. M. W., Ohl, Stephan** (1997) - Cellular and Molecular Aspects of Plant-Nematode Interactions. 206p, 202-203
- Francardi, V. & Pennacchio, F.** (1996) – Note sulla bioecologia di *Monochamus galloprovincialis* (Oliver) in Toscana e in Ligúria (Coleoptera; Cerambycidae). *Redia*.79(2): 153-169.
- Fonseca, L., J.M.S. Cardoso, A. Lopes, M. Pestana, F. Abreu, N. Nunes, M. Mota & I.**
- Tomminen, J. & Akar, H.** (1990) – Infestation of four coleopteran species by the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoidae) living in wood chips. *Entomologica Fennica.* 3(12): 171-174.
- Gleizes, Michel; Pauly, G.; Bernard-Dagan, C.; Jacques, R.** (2006)- Effects of light on terpene hydrocarbon synthesis in *Pinus pinaster*. *Physiologia Plantarum.* v. 50, Issue 1, pages 16–20.
- Hofmann, J., Szakasits, D., Blöchl, A., Sobczak, M., Daxböck-Horvath, S., Golinowski, W., Bohlmann, H., et al.** (2008). Starch serves as carbohydrate storage in nematode-induced syncytia. *Plant physiology*, 146(1), 228–35.
- Hausmann, BIG, Parkies HK, Prestrel T, Susik Z, Miedaner T** (2004) – Plant genetic resources in crop improvement. *Plant Genet Resour.* 2: 3-21.
- Hause, B., Stenzel, I., Miersch, O. e Wasternack, C.** (2003) Occurrence of the allene oxide cyclase in different organs and tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry.* 64, 971-980

**IFN5- 5º Inventário Florestal Relatório Final Lisboa, 2005-2006.**

**Johansen, D.A.** (1940) Plant microtechnique. New York: McGraw Hill Book. 523p.

**Kikuchi, T., Shibuya, H., & Jones, J. T.** (2005). 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(Pt 1), 117–25.

**Kasprzewska, A.** (2003). Plant chitinases-regulation and function. Cellular and Molecular Biology Letters, 8(March), 809–824.

**Kodan, A., Kuroda, H., & Sakai, F.** (2002). A stilbene synthase from Japanese red pine (*Pinus densiflora*): implications for phytoalexin accumulation and down-regulation of flavonoid biosynthesis. *Proceedings of the National*, 99(5), 3335–9.

**Kuroda, H; Kuroda, K** (1998) – Expression of stilbene synthase gene and pine wilt disease. Abstract of 7th international congress of plant pathology. 9-16 August 1998, Edinburgh UK

**Kiyohara, T. & Tokushige, Y.** (1971) – Inoculation experiments of a nematode, *Bursaphelenchus* sp., onto pine trees. *J. Jpn. For. Soc.* 53: 210-218.

**Lepoittevin, C., Frigerio, J\_M, Garnier-Géré, P., Salin, F., Cervera, MT, Vornam, B., Plomion, C.** (2010) - In vitro vs in silico detected SNPs for the development of a genotyping array: What can we learn from a non-model species? *Plos one* Volume 5 issue 6.

**Liu, J.-J., Sturrock, R., & Ekramoddoullah, A. K. M.** (2010). The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. *Plant cell reports*, 29(5), 419–36.

**Martins, A., Nogueira, T., Costa, M., & Salgueiro, L.** (2011). Requisitos de qualidade em óleos essenciais: a importância das monografias da Farmacopeia Europeia e das normas ISO, 11(2), 133–145.

**Moreira, X., Sampedro, L., & Zas, R.** (2009). Defensive responses of *Pinus pinaster* seedlings to exogenous application of methyl jasmonate: Concentration effect and systemic response. *Environmental and Experimental Botany*, 67(1), 94–100.

**Miller, B.; Madilao, L.L.; Ralph, S.; Bohlmann, J.**(2005) Insect-induced conifer defense. White Pine Weevil and methyl jasmonate induce traumatic resinosis de Novo formed volatile emissions, and accumulation of terpenoid synthase and putative octadecanoid pathway transcripts in Sitka Spruce. *Plant Physiology*, v. 137, p. 369-382.

**Maehara, N. & Futai, K.** (2001) – Presence of cerambycid beetles *Psacotha hilaris* and *Monochamus alternatus* affecting the life cycle strategy of *Bursaphelenchus xylophilus*. *Nematology*. 3(5): 455-461.

**Martinez, C.; Baccou, J. –C.; Bresson, E.; Baissac, Y.; Daniel, J. –F.; Jalloul, A.; Montillet, J. –L.; Geiger, J. –P.; Assigbetsé, K.; Nicole, M.**(2000) Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in local and systemic responses of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*. *Plant Physiology*, Bethesda, v. 122, p. 757-766.

- Mota, M.M.; Braasch, H.; Bravo, M.A.; Penas, A.C.; Burgermeister, W.; Metge, K. & Sousa, E.** (1999) – First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology*. 1(7-8): 727-734.
- Mamiya, Y.** (1984) – The pine wood nematode. in *Nickle ed. Plant and insect nematoda*: 589–626.
- Mussel, H.** (1980) – Tolerance to disease. in *Cowling & Horsfall eds. Plant Disease*: 39-61.
- Trudgill, D.L. (1991) – Resistance to and tolerance of plant parasitic nematodes in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26: 167-192.
- Naves, A. C.** (2008). Morphobiometric and molecular characterization of *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (nematoda: aphelenchoididae) species associated with pinus. Universidade de Évora.
- Naves, P.M.** (2007) – Biology of *Monochamus galloprovincialis* (coleoptera, *Cerambycidae*) and its role as vector of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (nematoda, *Parasitaphelenchidae*) in Portugal. Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor em Biologia. FC/UL. Lisboa. 166p.
- Neale D** (2007) – Genomics to tree Breeding and Forest Health. *Current Opinion in Genetics & Development* 17: 1-6.
- Necibi, S. & Linit, M.J.** (1998) – Effect of *Monochamus carolinensis* on *Bursaphelenchus xylophilus* dispersal stage formation. *J. Nematology*. 30(2): 246-254.
- Nobuchi, T.; Tominaga, T.; Futai, K. & Harada, H.** (1984) – Cytological study of pathological changes in japanese black pine (*Pinus thunbergii*) seedlings after inoculation with pine-wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *For. & For.Prod. Res. Inst.* 325: 97-126.
- Oehlschlager, A., & Chinchilla, C.** (2002). Control of red ring disease by mass trapping of *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: *Curculionidae*). *Florida*, 507–513.
- Provost, G., Herrera, R., Paiva, J. A., Chaumeil, P., Salin, F., & Plomion, C.** (2007). A micromethod for high throughput RNA extraction in forest trees. *Biological research*, 40(3), 291–7.
- Pot D, McMillan L, Echt C, Le Provost G, Garnier-Gere P**(2005) - Nucleotide variation in genes involved in wood formation in two pine species. *New Phytologist* 167: 101–112.
- Penas, A.C.; Correia, P.; Bravo, M.A.; Mota, M. & Tenreiro, R.** (2004) – Species of *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (nematoda: *Parasitaphelenchidae*) associated with maritime pine in Portugal. *Nematology*. 6(3): 437-453.
- Ryss, A., Ieira, P. V., Ota, M. M., & Ulinich, O. K.** (2005). A synopsis of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Aphelenchida: *Parasitaphelenchidae*) with keys to species, 7(3), 393–458.
- Ruzin SE.** 1999. Plant microtechnique and microscopy. 322 pp. Oxford, New York: Oxford University Press.

- Santos, C. S. S., & Vasconcelos, M. W.** (2011). Identification of genes differentially expressed in *Pinus pinaster* and *Pinus pinea* after infection with the pine wood nematode. *European Journal of Plant Pathology*, 132(3), 407–418.
- Shin, H., Lee, H., Woo, K.-S., Noh, E.-W., Koo, Y.-B., & Lee, K.-J.** (2009). Identification of genes upregulated by pinewood nematode inoculation in Japanese red pine. *Tree physiology*, 29(3), 411–21.
- Son, J. a., Komatsu, M., Matsushita, N., & Hogetsu, T.** (2009). Migration of pine wood nematodes in the tissues of *Pinus thunbergii*. *Journal of Forest Research*, 15(3), 186–193
- Szakasits, D., & Heinen, P.** (2009). The transcriptome of syncytia induced by the cyst nematode *Heterodera schachtii* in *Arabidopsis* roots. *The Plant*, 57(5), 771–84.
- Schaller, F., Zerbe, P., Reinbothe, S., Reinbothe, C., Hofmann, E. e Pollmann, S.** (2008) The allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*- localization and cyclization. *FEBS Journal*, 275, 2428-2441.
- SILVA, Joaquim Sande** (2007)- Pinhais e Eucaliptais - A floresta cultivada. Lisboa : Público, Comunicação Social, SA.
- Sathyapala, S.** (2004) – Pest risk analysis Biosecurity risk to New Zealand of Pinewood Nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). Ministry Agriculture Forestry: 1-37.
- Sousa, E.; Bravo, M.A.; Pires, J.; Naves, P.; Penas, A.C; Bonifácio, L. & Mota, M.** (2001) – *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda; Aphelenchoididae) associated with *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera; Cerambycidae) in Portugal. *Nematology*.3(1): 89-91.
- Stamps, W.T. & Linit, M.J.** (2001) – Interaction of intrinsic and extrinsic chemical cues in the behaviour of *Bursaphelenchus xylophilus* (Aphelenchida: Aphelenchoididae) in relation to its beetle vectors. *Nematology*. 3: 295–301.
- Schiffer, R., Görg, R., Jarosch, B., Beckhove, U., Bahrenberg, G., Kogel, K.-H. and Schulze-Lefert, P.** 1997. Tissue dependence and differential cordycepin sensitivity of race-specific resistance responses in the barley-powdery mildew interaction. *Mol. Plant- Microbe Interact.* 10: 830–839.
- Takemoto, S. & Futai, K.** (2007) – Polymorphism of Japanese isolates of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Aphelenchida: Aphelenchoididae), at heatshock protein 70A locus and the field detection of polymorphic populations. *Appl. Entomol. Zool.* 42(2): 247-253.
- Van Loon, L.C., Rep, M.; Pieterse, C.M.J.** (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 135–162.
- Veronico, P., Gray, L., Jones, J., Bazzicalupo, P., Arbucci, S., Cortese, M., Di, V. M., et al.** (2001). Nematode chitin synthases: gene structure, expression and function in

Caenorhabditis elegans and the plant parasitic nematode Meloidogyne artiellia. *Molecular Genetics and Genomics*, 266(1), 28–34

**Verbene, M. C.; Verpoorte, R.; Bol, J. F.; Mercado-Blanco, J.; Linthorst, H. J. M.** (2000)- Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nature Biotechnology*, New York, v. 18, p. 779-783.

**Van Loon, L.C., E.A. Van Strien,** (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 55, 85–97.

**Velasco-Conde, T., Yakovlev, I., Majada, J. P., Aranda, I., & Johnsen,** (2012). Dehydrins in maritime pine (*Pinus pinaster*) and their expression related to drought stress response. *Tree Genetics & Genomes*.

**Warren, J. E., & Linit, M. J.** (1993). Effect of *Monochamus carolinensis* on the Life History of the Pinewood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Journal of nematology*, 25(4), 703–9

**Xu, Y., Zhang, Y., Li, Y., Li, G., Liu, D., Zhao, M., & Cai, N.** (2012). Growth Promotion of Yunnan Pine Early Seedlings in Response to Foliar Application of IAA and IBA. *International journal of molecular sciences*, 13(5), 6507–20.

**Zhuo, K., Luo, M., Cui, R. Q., & Liao, J. L.** (2011). A multiplex one-step PCR method for the simultaneous identification of *Bursaphelenchus xylophilus*, *B. mucronatus* and *B. doui*- three species within the *xylophilus* group. *Forest Pathology*, 41(1), 66–69.

**Zareie, R.; Melanson, D. L.; Murphy, P. J.**(2002) Isolation of fungal cell wall degrading proteins from barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves infected with *Rhynchosporium secalis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, St. Paul, v. 15, n. 10, p. 1031-1039