

# **Microbiomas endófitos de plantas suscetíveis a infecção por *Xylella fastidiosa***

**Rita Vanessa Pereira Ramos**

Relatório de Estágio para obtenção do Grau de Mestre em  
**Bioquímica**  
(2.º ciclo de estudos)

Orientador: Doutor Christophe Ruis Espírito Santo  
Coorientadora: Doutora Joana Cardoso da Costa  
Coorientador: Prof. Doutor António José Geraldês de Mendonça

**junho de 2022**



## Declaração de Integridade

Eu, Rita Vanessa Pereira Ramos, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M10946 de Bioquímica da Faculdade de Ciências, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 28 / 06 / 2022

Rita Ramos



O presente trabalho foi desenvolvido no Centro de Apoio Tecnológico Agro-Alimentar (CATAA), em colaboração com o Instituto Pedro Nunes (IPN) no âmbito do projeto CULTIVAR (CENTRO-01-0145- FEDER-000020), cofinanciado pelo Programa Operacional Regional do Centro 2020, Portugal 2020 e União Europeia, através do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) e do projeto XylOut (PTDC/ASP-PLA/3145/2021), financiado por fundos nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P.

Cofinanciado por:





# Agradecimentos

A realização deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração e a oportunidade dada pelo Centro de Apoio Tecnológico Agro-Alimentar de Castelo Branco e do Fitolab – Instituto Pedro Nunes. Tal como não teria sido possível sem o contributo de todos os que de alguma forma fizeram parte deste projeto.

Um grande agradecimento ao Christophe Espírito Santo e à Inês Brandão pelos ensinamentos, oportunidades e confiança.

À Alexandra e ao Mário pela paciência, apoio e compreensão que demonstraram ao longo de todo o meu estágio curricular, contribuindo assim, para uma experiência muito enriquecedora.

À Joana Costa, um enorme obrigada pela disponibilidade, apoio e dedicação.

Ao João Trovão, Daniela, Eva e Sara pela ajuda, disponibilidade e simpatia.

Aos meus amigos que estão comigo desde o início desta incrível experiência, pelos bons momentos vividos e por fazerem estes cinco anos memoráveis!

À Joana Carreira pela amizade e momentos partilhados. Obrigada por tudo.

Por último, mas não menos importante à minha família, especialmente aos meus pais e ao meu irmão, sem vocês nada disto seria possível. Graças a vocês consegui alcançar mais uma etapa tão importante na minha vida. Obrigada pelo amor, dedicação, motivação e confiança que sempre me deram.



## Resumo

*Xylella fastidiosa* (*Xf*) é uma das bactérias fitopatogénicas mais perigosas do mundo, sendo responsável por uma vasta gama de doenças com enorme impacto económico e ambiental. O papel central do microbioma associado à planta na manutenção do *fitness* é crucial, no entanto, pouco se sabe sobre a diversidade e estrutura dessas comunidades de microrganismos endófitos. Atualmente, a procura de alternativas para o controlo e/ou mitigação de doenças das plantas é uma estratégia prioritária para a agricultura sustentável. Desta forma, é essencial estudar a diversidade estrutural da comunidade microbiana endófito e as interações entre endófitos e plantas para elucidar o potencial biotecnológico desses microrganismos. Neste contexto, um dos objetivos deste trabalho foi caracterizar a diversidade estrutural de microrganismos endófitos em espécies de plantas silvestres suscetíveis à infeção por *Xf* e presentes na zona de foco em Portugal. Desta forma, amostras em que *Xf* foi detetada e amostras em que *Xf* não foi detetada foram sequenciadas através da tecnologia ONT. Os resultados da análise da diversidade estrutural das comunidades endófitas mostraram que, de forma geral, as amostras partilham os mesmos géneros nomeadamente, *Ralstonia*, *Caballeronia*, *Stanieria*, *Aliterella* e *Loriellopsis*, porém na maioria dos casos não partilham as espécies dominantes. Salienta-se a importância funcional de alguns dos grupos pertencentes ao *core microbiome*, nomeadamente a capacidade de degradação de substâncias tóxicas, fixação de nitrogénio e promoção do crescimento das plantas. A ausência de sintomas visíveis nestas plantas silvestres, e a ausência de sinais de declínio, podem estar relacionadas com a presença de determinados grupos taxonómicos na comunidade endófito que pela sua função possam promover a modelação da infeção. É também importante salientar que este é o primeiro estudo em plantas silvestres pelo que a identificação destas bactérias pode constituir um ponto de partida para ajudar a compreender o impacto de *Xf* na disbiose do microbioma. Também é relevante salientar que no microbioma em que a abundância relativa de *Xf* é maior, passam a ser detetados outros organismos fitopatogénicos, nomeadamente *Xanthomonas*, permitindo inferir que a sintomatologia e declínio podem ser causados pela ação cumulativa de diversos organismos patogénicos.

## Palavras-chave:

*Xylella fastidiosa*; Microbioma endófito; gene 16S rRNA; Oxford Nanopore Technology



## Abstract

*Xylella fastidiosa* is one of the most dangerous phytopathogenic bacteria in the world, being responsible for a wide range of diseases with enormous economic and environmental impact. The central role of the plant-associated microbiome in maintaining the fitness is crucial, however, little is known about the diversity and structure of these communities of endophytic microorganisms. Currently, the search for alternatives for the control and/or mitigation of plant diseases is a strategic priority for sustainable agriculture. Therefore, this study is essential to understand the endophytic microbial community diversity and the interactions between endophytes and plants, expanding these microorganisms' biotechnological potential. In this context, one of the objectives of this work was to characterize the structural diversity of endophytic microorganisms in wild plant species susceptible to *Xf* infection and present in the focus zone in Portugal. In this way, samples where *Xf* was detected and samples where *Xf* was not detected were sequenced using ONT technology. The results of the analysis of the structural diversity of the endophytic communities showed that, in general, the samples share the same genera, namely, *Ralstonia*, *Caballeronia*, *Stanieria*, *Aliterella* and *Loriellopsis*, but in most cases, they do not share the dominant species. The functional importance of some of the groups belonging to the core microbiome is emphasized, namely the ability to degrade toxic substances, fix nitrogen and promote plant growth. The absence of visible symptoms in these wild plants, and the absence of signs of decline, may be related to the presence of certain taxonomic groups in the endophyte community that, due to their function may promote the modelling of the infection. It is also important to note that this is the first study in wild plants, so the presence of these bacteria may be a starting point to help understand the impact of *Xf* on microbiome dysbiosis. It is also relevant to point out that in the microbiome where the relative abundance of *Xf* is higher, other phytopathogenic organisms are detected, namely *Xanthomonas*, allowing us to infer the symptomatology and decline may be caused by the cumulative action of several pathogenic organisms.

## Keywords

*Xylella fastidiosa*; Endophytic Microbiomes; 16S rRNA gene; Oxford Nanopore Technology



# Índice

<b>Capítulo 1 – Introdução</b> .....	1
1.1 <i>Xylella fastidiosa</i> .....	3
1.1.1 Classificação e morfologia .....	3
1.1.2 Hospedeiros, subespécies e doenças .....	3
1.1.3 Insetos vetores e transmissão .....	4
1.1.4 Sintomas .....	5
1.1.5 Epidemiologia .....	5
1.1.6 Distribuição geográfica .....	6
1.1.7 Isolamento .....	7
1.1.8 Detecção e identificação .....	7
1.1.9 Medidas de controlo e prevenção .....	8
1.2 Análise MLST .....	8
1.3 Microbiomas endófitos .....	9
1.4 Técnicas de Sequenciação .....	10
1.4.1 Sequenciação por nanoporos .....	12
<b>Capítulo 2 – Objetivo</b> .....	17
<b>Capítulo 3 – Materiais e Métodos</b> .....	21
3.1 Colheita .....	23
3.2 Esterilização da superfície e isolamento de <i>Xf</i> .....	24
3.3 Extração de DNA total de amostras vegetais .....	24
3.4 Identificação bacteriana .....	25
3.5 Análise Multilocus Sequence Typing (MLST) .....	26
3.5.1 Análise dos produtos de amplificação .....	27
3.5.2 Purificação dos produtos de PCR .....	27
3.5.3 Sequenciação dos produtos de amplificação .....	28
3.6 Amplificação do gene 16S rRNA .....	29
3.6.1 Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação .....	31
3.6.2 Purificação dos produtos de PCR .....	31
3.6.3 Sequenciação do gene 16S rRNA .....	31
3.7 Análise bioinformática .....	32
<b>Capítulo 4 – Resultados e Discussão</b> .....	33
4.1 Isolamento de <i>Xf</i> .....	35
4.2 Detecção molecular de <i>Xf</i> .....	35
4.3 Análise MLST .....	37

4.4 Amplificação do gene 16S rRNA.....	41
4.5 Sequenciação do gene 16S rRNA por nanoporos .....	44
<b>Capítulo 5 - Conclusões e Perspetivas Futuras.....</b>	<b>65</b>
<b>Capítulo 6 – Bibliografia.....</b>	<b>69</b>

# Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida da <i>Xf</i> .....	5
Figura 2. Distribuição geográfica da <i>Xf</i> . ....	6
Figura 3. Representação esquemática da sequenciação por nanoporos.....	13
Figura 4. Dispositivos da ONT disponíveis no mercado.....	14
Figura 5. Controlo interno de extração de DNA para as amostras em análise. ....	35
Figura 6. Curvas de amplificação de RT-PCR de acordo com o método de Harper para a deteção molecular de <i>Xf</i> . ....	37
Figura 7. Análise dos produtos da reação de PCR em gel de agarose para o gene <i>leuA</i> . ....	38
Figura 8. Análise dos produtos da reação de PCR em gel de agarose para o gene <i>petC</i> .....	38
Figura 9. Análise dos produtos da reação de PCR em gel de agarose para o gene <i>malF</i> .....	38
Figura 10. Análise dos produtos da reação de PCR em gel de agarose para o gene <i>cysG</i> .....	39
Figura 11. Análise dos produtos da reação de PCR em gel de agarose para o gene <i>holC</i> .....	39
Figura 12. Análise dos produtos da reação de PCR em gel de agarose para o gene <i>nuoL</i> . ....	39
Figura 13. Análise dos produtos da reação de PCR em gel de agarose para o gene <i>gltT</i> . ....	40
Figura 14. Amplificação do gene 16S rRNA com a enzima <i>Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase</i> e a <i>NZYTaq II 2x Green Master Mix</i> para a amostra 46F.....	41
Figura 15. Amplificação do gene 16S rRNA com a enzima <i>NZYTaq II 2x Green Master Mix</i> . 42	
Figura 16. Re-amplificação do gene 16S rRNA com 2 $\mu$ L do DNA amplificado.....	43
Figura 17. Rendimento (Mega bases) por hora (h) das sequências analisadas. ....	44
Figura 18. Qualidade das leituras ( <i>qscore</i> ) das amostras sequenciadas.....	45
Figura 19. Comprimento das sequências analisadas. ....	45
Figura 20. Árvore filogenética ao nível da espécie relativa a todas as amostras com um <i>cutoff</i> de abundância relativa de 0.1%.....	47
Figura 21. Árvore filogenética ao nível da espécie da amostra 42R, baseada na análise completa do gene 16S rRNA obtido através da plataforma <i>MinION</i> e analisado com o <i>software</i> EPI2ME. ....	50

Figura 22. Árvore filogenética ao nível da espécie da amostra 43F, baseada na análise completa do gene 16S rRNA obtido através da plataforma <i>MinION</i> e analisado com o <i>software</i> EPI2ME. .....	51
Figura 23. Árvore filogenética ao nível da espécie da amostra 45F, baseada na análise completa do gene 16S rRNA obtido através da plataforma <i>MinION</i> e analisado com o <i>software</i> EPI2ME. .....	52
Figura 24. Árvore filogenética ao nível da espécie da amostra 45R, baseada na análise completa do gene 16S rRNA obtido através da plataforma <i>MinION</i> e analisado com o <i>software</i> EPI2ME. .....	53
Figura 25. Árvore filogenética ao nível da espécie da amostra 46F, baseada na análise completa do gene 16S rRNA obtido através da plataforma <i>MinION</i> e analisado com o <i>software</i> EPI2ME. .....	54
Figura 26. Árvore filogenética ao nível da espécie da amostra 85, baseada na análise completa do gene 16S rRNA obtido através da plataforma <i>MinION</i> e analisado com o <i>software</i> EPI2ME. .....	55
Figura 27. Árvore filogenética ao nível da espécie da amostra 193F, baseada na análise completa do gene 16S rRNA obtido através da plataforma <i>MinION</i> e analisado com o <i>software</i> EPI2ME. .....	56
Figura 28. Árvore filogenética ao nível da espécie da amostra 193R, baseada na análise completa do gene 16S rRNA obtido através da plataforma <i>MinION</i> e analisado com o <i>software</i> EPI2ME. .....	57
Figura 29. Árvore filogenética ao nível da espécie da amostra 197, baseada na análise completa do gene 16S rRNA obtido através da plataforma <i>MinION</i> e analisado com o <i>software</i> EPI2ME. .....	58
Figura 30. Árvore filogenética ao nível da espécie da amostra 198F, baseada na análise completa do gene 16S rRNA obtido através da plataforma <i>MinION</i> e analisado com o <i>software</i> EPI2ME. .....	59
Figura 31. Árvore filogenética ao nível da espécie da amostra 198R, baseada na análise completa do gene 16S rRNA obtido através da plataforma <i>MinION</i> e analisado com o <i>software</i> EPI2ME. .....	60
Figura 32. Árvore filogenética ao nível da espécie da amostra 199R, baseada na análise completa do gene 16S rRNA obtido através da plataforma <i>MinION</i> e analisado com o <i>software</i> EPI2ME. .....	61

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Informações sobre a localização, espécie e data de colheita das amostras.....	23
Tabela 2. Mistura para as reações de PCR em tempo real .....	25
Tabela 3. Sequências de <i>primers</i> e condições para as reações de PCR em tempo real .....	26
Tabela 4. Sequências de <i>primers</i> e tamanho do amplificado dos sete genes <i>housekeeping</i> usados na análise MLST ( <i>leuA</i> , <i>petC</i> , <i>malF</i> , <i>cysG</i> , <i>holC</i> , <i>nuoL</i> e <i>gltT</i> ) .....	26
Tabela 5. Mistura para as reações de PCR para análise MLST .....	27
Tabela 6. Sequência dos <i>primers</i> usados para amplificação do gene 16S rRNA. ....	29
Tabela 7. Mistura para as reações de PCR para amplificação do gene 16S rRNA com a enzima <i>NZYTaq II 2x Green Master Mix</i> . ....	30
Tabela 8. Mistura para as reações de PCR para amplificação do gene 16S rRNA com a enzima <i>Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase</i> . ....	30
Tabela 9. Resultados dos ensaios de detecção molecular de <i>Xf</i> por RT-PCR de acordo com os métodos de Harper e Ouyang.....	36
Tabela 10. Amostras usadas para o ensaio de sequenciação e o respectivo resultado do RT-PCR.....	43
Tabela 11. Informação sobre a amostra, o hospedeiro e as respectivas cinco espécies com maior abundância relativa. ....	63



## Lista de Abreviaturas e Acrónimos

16S rRNA	Gene RNA Ribossomal 16S
A	Adenina
BCYE	<i>Buffered Charcoal Yeast Extract</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
C	Citosina
CATAA	Centro de Apoio Tecnológico Agro Alimentar
COX	Gene citocromo oxidase
Cq	<i>Quantification cycle</i>
CTAB	<i>Cetyltrimethylammonium Bromide</i>
<i>cysG</i>	<i>Sirohaem Synthase</i>
ddNTPs	Dideoxynucleótidos
DIBA	<i>Dot-immunobinding assay</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
DTBIA	<i>Direct Tissue Immuno Blot Assay</i>
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPPO	<i>European and Mediterranean Plant Protection Organization</i>
F	Folhas
FitoLab	Laboratório de Fitossanidade
G	Guanina
<i>glT</i>	<i>Glutamate Symport Protein</i>
<i>holC</i>	<i>DNA polymerase III holoenzyme chi subunit</i>
LAMP	<i>Loop-Mediated Isothermal Amplification</i>
<i>leuA</i>	<i>2-isopropylmalate synthase</i>
<i>malF</i>	<i>ABC transporter sugar permease</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
NAC	Controlo Negativo de Amplificação
NaClO	Hipoclorito de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
<i>nuoL</i>	<i>NADH ubiquinone oxidoreductase NQO12 subunit</i>
ONT	<i>Oxford Nanopore Technologies</i>

PAC	Controlo Positivo de Amplificação
PacBio	<i>Pacific Biosciences</i>
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>petC</i>	<i>Ubiquinol Cytochrome C Oxidoreductase C1 Subunit</i>
PNA	Polímero de Ácido Nucleico
PWG	<i>Periwinkle Wilt Gelrite</i>
R	Ramos
RNA	Ácido ribonucleico
RT- PCR	<i>Real -Time Polymerase Chain Reaction</i>
<i>SMRT</i>	<i>Single Molecule Real Time</i>
ssDNA	Ácido desoxirribonucleico de cadeia simples
ST	<i>Sequence Type</i>
T	Timina
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tris-Borato-EDTA
UE	União Europeia
<i>Xf</i>	<i>Xylella fastidiosa</i>

# Capítulo 1 – Introdução



## **1.1 *Xylella fastidiosa***

### **1.1.1 Classificação e morfologia**

*Xylella fastidiosa* (*Xf*) é uma das bactérias fitopatogénicas mais perigosas do mundo, sendo responsável por uma vasta gama de doenças com enorme impacto económico e ambiental (Camino *et al.*, 2021).

O género *Xylella* tem apenas uma espécie designada *Xylella fastidiosa*, descrita por Wells e colaboradores (Wells *et al.*, 1987). Embora seja a única espécie do género, a bactéria *Xf* possui uma diversidade genotípica e fenotípica substancial (Jeger *et al.*, 2018).

*Xf* é uma bactéria gram-negativa da família *Xanthomonadaceae*, ordem *Xanthomonadales*, com forma de bastonete, paredes celulares onduladas e desprovida de flagelo, apresenta dimensões estimadas de 0,25 a 0,5 µm de diâmetro e 0,9 a 4,0 µm de comprimento (Almeida *et al.*, 2014). São estritamente aeróbicas e com crescimento ótimo a 26-28°C (Baldi & La Porta, 2017).

### **1.1.2 Hospedeiros, subespécies e doenças**

*Xf* é o agente causal de uma vasta gama de doenças de plantas economicamente importantes, incluindo inúmeras espécies agrícolas, florestais e ornamentais (Jeger *et al.*, 2018; Godefroid *et al.*, 2019; Greco *et al.*, 2021).

Desde 2017, *Xf* foi classificada na lista EPPO A2 como um patógeno de quarentena presente no território da União Europeia (UE) devido ao seu potencial destrutivo, exigindo por isso um controlo obrigatório (Dupas *et al.*, 2019; Greco *et al.*, 2021). Atualmente, de acordo com a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), a lista de hospedeiros de *Xf* consiste em 655 espécies diferentes pertencentes a 88 famílias de plantas (Delbianco *et al.*, 2022). Apesar do processo de infeção ser sempre o mesmo, os sintomas e as doenças causadas por esta bactéria podem variar entre espécies (Baldi & La Porta, 2017).

Inicialmente, *Xf* foi incluída num grupo de bactérias capazes de infetar uma vasta gama de plantas hospedeiras, no entanto, no início dos anos 90, com a introdução de técnicas de genotipagem baseadas em DNA, os investigadores começaram a dividir as espécies em diferentes grupos genéticos (Baldi & La Porta, 2017).

Até ao momento, foram descritas e classificadas seis subespécies de *Xf* (*fastidiosa*, *multiplex*, *pauca*, *sandyi*, *tashke* e *morus*) associadas a doenças graves, que afetam diferencialmente uma variedade de culturas (Godefroid *et al.*, 2019).

*Xf* subespécie *fastidiosa* causa a doença de Pierce, uma das doenças mais perigosas da videira (*Vitis vinifera*), tendo sido também detetada numa vasta variedade de plantas perenes e arbustos; a subespécie *multiplex* foi detetada principalmente em árvores florestais e em *Prunus* spp., estando relacionada com a doença da queimadura foliar nas amendoeiras (*Prunus dulcis*); a subespécie *pauca* está associada à clorose variegada dos citrinos (*Citrus* spp.), com o síndrome do declínio rápido da oliveira (*Olea europaea*) e com queimaduras na folha do café; a subespécie *sandyi* é responsável pela queimadura das folhas de oleandro (*Nerium oleander*); a subespécie *tashke* causa queimaduras das folhas em *Chitalpa tashkentensis*; e por fim a subespécie *morus* provoca queimaduras nas folhas da amoreira vermelha (*Morus rubra*) (Greco *et al.*, 2021; EPPO, 2019; Baldi & La Porta, 2017). No entanto, cada subespécie está mais associada a um determinado grupo de espécies hospedeiras, ainda que possa infetar outras espécies vegetais (Godefroid *et al.*, 2019).

### **1.1.3 Insetos vetores e transmissão**

*Xf* coloniza dois habitats distintos, o xilema das plantas hospedeiras e o tubo digestivo de insetos picadores-sugadores de seiva. A bactéria é transmitida por insetos vetores, principalmente cigarrinhas, pertencentes à ordem Hemiptera (Aphrophoridae, Cercopidae, Cicadellidae, Cicadidae e Clastopteridae), que se alimentam do xilema das plantas hospedeiras (Greco *et al.*, 2021). Estes vetores podem pertencer a diversas espécies e diferir de país para país (Greco *et al.*, 2021).

Uma vez que a transmissão de *Xf* por insetos não requer período de incubação, os vetores que adquirem a bactéria, enquanto se alimentam do xilema de plantas infetadas, podem inocular o patógeno em plantas saudáveis imediatamente após a aquisição (Figura 1). Uma vez infetadas, os vetores adultos podem transmitir a bactéria durante toda a vida, embora não exista transmissão à descendência (EPPO, 2019).

Depois de inoculadas em plantas suscetíveis, as células bacterianas, restritas ao canal alimentar dos vetores, aderem às paredes dos vasos e multiplicam-se ativamente em regiões específicas do intestino anterior, produzindo exopolissacarídeos e formando biofilmes. A formação destes biofilmes conduz ao bloqueio dos vasos do xilema, impedindo o transporte de água e sais minerais (Almeida *et al.*, 2014; European Food Safety Authority, 2013). Este processo pode culminar com o aparecimento de sintomas, que podem ser confundidos com deficiências nutricionais, stress hídrico ou associados a outros patógenos (Baldi & La Porta, 2017). O tempo de inoculação e o aparecimento de sintomas na planta é altamente variável, alterando de acordo com a espécie, idade da planta e condições edafoclimáticas (Jeger *et al.*, 2018).

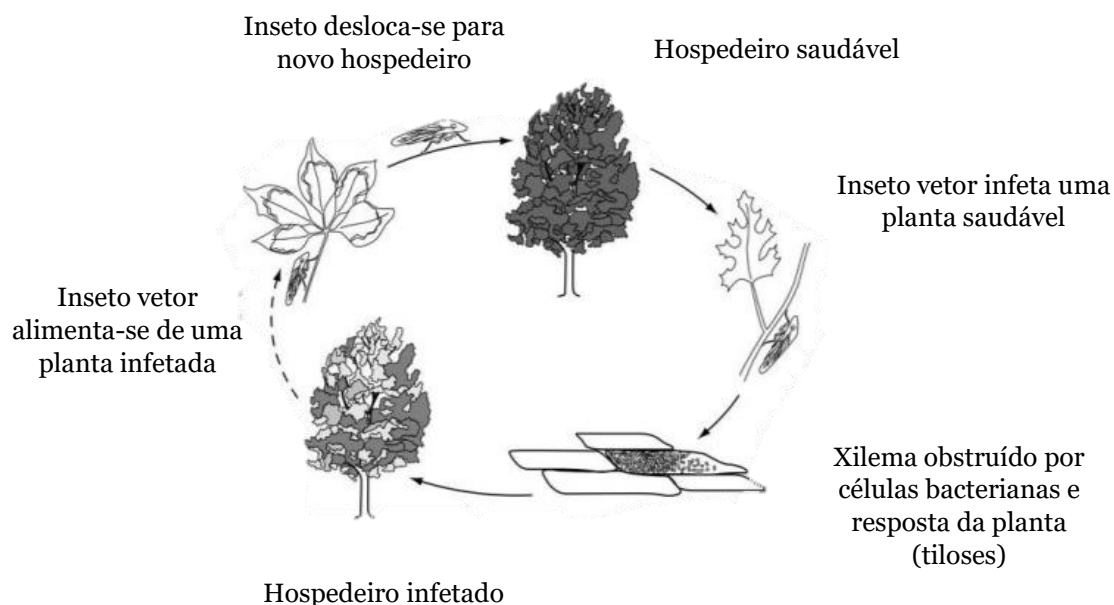


Figura 1. Ciclo de vida da *Xf*, adaptado de Gould & Lashomb, 2007.

#### 1.1.4 Sintomas

Dada a taxa de crescimento lenta da *Xf*, os sintomas da doença manifestam-se normalmente muito tardiamente, o que dificulta a implementação de medidas de controlo (Jeger *et al.*, 2018). Os sintomas em plantas hospedeiras, geralmente, incluem oclusão dos vasos do xilema, queimaduras das folhas, murchidão foliar, necrose marginal da folha, queda e floração prematura, redução da produção e dimensão dos frutos, e endurecimentos dos mesmos. No entanto, em casos mais graves, a infeção por *Xf* conduz à morte da planta (Rapicavoli *et al.*, 2018; EPPO, 2019).

Normalmente, os sintomas aparecem em apenas alguns ramos, espalhando-se posteriormente pela planta (EPPO, 2019). Contudo, os sintomas de *Xf* podem não ser evidentes, sendo que muitos hospedeiros podem conter infeções assintomáticas, o que dificulta a deteção precoce desta bactéria (Faino *et al.*, 2021).

O desenvolvimento da doença depende da capacidade da bactéria se deslocar do ponto de inoculação, proliferar dentro dos vasos do xilema e colonizar toda a planta (D'attoma *et al.*, 2019).

#### 1.1.5 Epidemiologia

O aparecimento de doenças provocadas por *Xf* e a gravidade das mesmas tem vindo a aumentar, possivelmente devido ao aquecimento global e às alterações climáticas. Também as práticas agrícolas podem ser influentes na gravidade de potenciais epidemias (Godefroid *et al.*, 2019).

Climas tropicais e mediterrâneos caracterizados com invernos amenos favorecem maiores taxas de sobrevivência de insetos vetores e maiores taxas de transmissão de *Xf*,

embora também possa ser encontrada em climas mais frios (Jeger *et al.*, 2018; Almeida *et al.*, 2014; Janse *et al.*, 2010). Por outro lado, temperaturas frias do inverno podem afetar a sobrevivência de *Xf* nos vasos do xilema e permitir que as plantas recuperem parcialmente de doenças induzidas por *Xf* (Godefroid *et al.*, 2019).

Desta forma, a Europa reúne condições favoráveis para a disseminação desta bactéria, tornando-se assim uma ameaça, não só para agricultura como para a biodiversidade (Jeger *et al.*, 2018). A avaliação da área de estabelecimento de *Xf* na UE demonstra que a maior parte do território apresenta alguns riscos associados, contudo o sul da Europa exibe um risco mais acentuado (Bragard *et al.*, 2019).

### 1.1.6 Distribuição geográfica

*Xf* é nativa do continente americano onde se manteve restrita até ao seu aparecimento na Ásia (Taiwan e Irão) (Denancé *et al.*, 2017) (Figura 2). A disseminação de *Xf* e as doenças associadas é atribuída principalmente à atividade humana que introduz vetores de insetos ou material vegetal infetado numa nova região (Rapicavoli *et al.*, 2018).



Figura 2. Distribuição geográfica da *Xf*, adaptado da EPPO, 2021.

O primeiro surto de *Xf* na Europa foi declarado em 2013, em oliveiras no sul de Itália, região de Apúlia, onde se identificou a subespécie *pauca*, estirpe CoDIRO (Godefroid *et al.*, 2019). Foi posteriormente detetada em França (Ilha de Córsega e na região Provença-Alpes-Costa Azul em 2015), em 2016, na Alemanha em plantas de alecrim e oleandro (Dupas *et al.*, 2019; Godefroid *et al.*, 2019; Rapicavoli *et al.*, 2018; Sicard *et al.*, 2018). E em Espanha (Ilhas Baleares em 2016, na província de Valência em 2017 e Madrid em 2018).

Em 2019, foi confirmada pela primeira vez a presença de *Xf* em Portugal, num jardim público em Vila Nova de Gaia, numa sebe ornamental de *Lavandula dentata*, sendo identificada como pertencente à subespécie *multiplex* (Despacho n.º 6/G/2022). Em 2021, foi confirmada pela primeira vez a presença da bactéria em viveiros em Massamá e Monte Abraão, no concelho de Sintra, e também no concelho de Tavira, numa amostra de *Salvia rosmarinus* (Despacho n.º 40/2021; Despacho n.º 12/G/2022). De acordo com a Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), em fevereiro de 2022, foi confirmada a presença da bactéria em nove novos locais, tendo sido até ao momento identificadas cinquenta e seis espécies vegetais infetadas na área metropolitana do Porto (Despacho n.º 6/G/2022).

### **1.1.7 Isolamento**

*Xf* é uma bactéria muito difícil de isolar e crescer em cultura axénica, requerendo meios específicos e enriquecidos para crescimento *in vitro* (Wells *et al.*, 1987), como *Periwinkle Wilt Gelrite* (PWG) ou *Buffered Charcoal Yeast Extract* (BCYE) (Cariddi *et al.*, 2014; EPPO, 2019). Estes meios são amplamente utilizados para o isolamento de diferentes espécies, contudo, uma vez que o crescimento desta bactéria é lento podem ser necessárias duas a três semanas até se observar o aparecimento de colónias (EPPO, 2019; Baldi & La Porta, 2017). Em ambos os meios, as colónias são pequenas (inferiores a 1 mm), circulares e convexas (Cariddi *et al.*, 2014). No meio BCYE, as colónias de *Xf* são opacas e esbranquiçadas, contrastando com o meio preto devido à presença do carvão. No meio PWG as colónias são brilhantes e translúcidas (Cariddi *et al.*, 2014; Janse *et al.*, 2010). Geralmente, é recomendado o uso de, pelo menos, dois meios de cultura diferentes para isolar a bactéria. Para o isolamento, é importante o processo de desinfeção da superfície das amostras para evitar o crescimento de organismos saprófitas e limitar o desenvolvimento de outros microrganismos nas placas (EPPO, 2019).

### **1.1.8 Detecção e identificação**

A concentração de células bacterianas numa planta depende de fatores ambientais, da estirpe e da espécie hospedeira infetada, no entanto, não são necessárias muitas células bacterianas para causar doenças numa planta saudável (EPPO, 2019). Teoricamente, o período de colheita é possível durante todo o período de vegetação, contudo, para maximizar a probabilidade de deteção, a amostragem deve ser realizada durante o período de crescimento ativo da planta (European Commission, 2015).

No entanto, muitas plantas hospedeiras infetadas com *Xf* não apresentam sintomas, o que dificulta a deteção precoce deste organismo. As abordagens para o diagnóstico de *Xf* incluem o isolamento em meios de cultura, testes serológicos e testes moleculares (EPPO, 2019).

Os testes serológicos para a detecção de *Xf* incluem *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), *Dot-immunobinding assay* (DIBA), *Direct Tissue Immuno Blot Assay* (DTBIA), imunofluorescência indireta e *Western blotting*. Os testes moleculares incluem *Polymerase Chain Reaction* (PCR), *real-time PCR* (RT-PCR) e *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP) (Waliullah *et al.*, 2019; Baldi & La Porta, 2017; Yaseen *et al.*, 2015).

### **1.1.9 Medidas de controlo e prevenção**

A capacidade para infetar muitas espécies de plantas e a falta de tratamentos eficazes, tornam o controlo das infeções por *Xf* muito desafiante, exigindo um conjunto de estratégias para evitar a sua disseminação. Apesar de não haver um tratamento específico, as estratégias de controlo aplicadas na UE centram-se essencialmente na remoção de plantas infetadas e todos os hospedeiros da subespécie detetada numa determinada área, controlo da população de insetos vetores e restrições à movimentação de plantas (Schneider *et al.*, 2020; Janse *et al.*, 2010), sendo que a procura de alternativas para uma agricultura sustentável é hoje uma estratégia prioritária para o controlo de muitas doenças de plantas. Assim, uma medida indispensável para evitar a introdução e o estabelecimento da bactéria é a realização de prospeções intensivas (Cardone *et al.*, 2021).

O Regulamento de Execução (UE) 2021/2285, exige que, após a detecção de um surto de *Xf*, as autoridades fitossanitárias estabeleçam, de imediato, uma zona demarcada, que inclui uma zona infetada e uma zona tampão. A zona infetada deve ter um raio de, pelo menos, 50 metros em torno das plantas infetadas por *Xf*, sendo que se deve proceder à destruição das plantas hospedeiras da subespécie identificada, após realização de um tratamento adequado para eliminar potenciais insetos vetores. Na zona tampão são realizados ensaios para a detecção da bactéria em todas as plantas suscetíveis. O Regulamento de Execução (UE) 2021/2285, também inclui outras medidas como a proibição de plantação nas zonas infetadas de plantas hospedeiras e a proibição de comercialização de qualquer planta para fora da zona demarcada (Morelli *et al.*, 2021; Regulamento de Execução (UE) 2021/2285).

Posto isto, torna-se essencial desenvolver métodos de diagnóstico específicos e mais sensíveis, bem como ferramentas capazes de detetar precocemente *Xf*.

## **1.2 Análise MLST**

*Multilocus Sequence Typing* (MLST) é um método de tipagem baseado na análise de sequências nucleotídicas provenientes de múltiplos locais do cromossoma (Heliodoro, 2017). Este esquema aplicado à *Xf* analisa geralmente sequências parciais de sete genes *housekeeping*: *2-isopropylmalate synthase (leuA)*; *ubiquinol cytochrome c*

*oxidoreductase C1 subunit (petC)*; *ABC transporter sugar permease (malF)*; *sirohaem synthase (cysG)*; *DNA polymerase III holoenzyme chi subunit (holC)*; *NADH ubiquinone oxidoreductase NQO12 subunit (nuoL)*; e *glutamate symport protein (gltT)* (EPPO, 2019). É uma técnica simples e recomendada para identificação de subespécies e para a determinação do *Sequence Type* (ST), no caso de um novo surto ou novos hospedeiros. A caracterização bacteriana baseia-se na avaliação da variação genética entre os isolados (Faino *et al.*, 2021) por comparação com bases de dados específicas (<https://pubmlst.org/organisms/xylella-fastidiosa>) (Jolley *et al.*, 2018). Para um determinado isolado bacteriano, os alelos de cada um dos sete genes definem inequivocamente o ST. Cada sequência de um determinado gene é atribuída a um alelo distinto (Dingle & MacCannell, 2015). Resumidamente, cada alelo de um determinado gene recebe um número, de forma que diferentes linhagens de bactérias possam ser caracterizadas por uma série de números, representando um alelo para cada *locus* analisado. A combinação dos números dos alelos em cada *locus* determina o ST para cada estirpe (Baldi & La Porta, 2017).

As vantagens do MLST são alta resolução e reprodutibilidade, análise rápida e fácil interpretação dos dados de sequenciação, que normalmente são disponibilizados eletronicamente através de bancos de dados públicos (Baldi & La Porta, 2017). Embora este método tenha sido usado principalmente para definir estruturas taxonômicas e relações evolutivas de diversas bactérias, também pode ser útil em investigações epidemiológicas (Rong & Huang, 2014).

Esta técnica está incluída nos testes validados para identificação e determinação da subespécie de *Xylella fastidiosa* (EPPO, 2019) pelo que, nos últimos anos, tem sido amplamente utilizada para a caracterizar (Jeger *et al.*, 2018).

### **1.3 Microbiomas endófitos**

De forma a encontrar estratégias para controlar as diversas doenças causadas por *Xf* torna-se essencial compreender a sua relação com as bactérias endófitas do hospedeiro, podendo esta relação ser relevante na epidemiologia da doença.

O sistema vascular das plantas garante-lhes várias funções biológicas importantes, sendo o xilema e o floema os principais veículos para o transporte de água, nutrientes, sacarose, entre outros. Contudo, há vários fatores, bióticos e abióticos, que comprometem a integridade do sistema vascular e prejudicam o fluxo de seiva na planta (Blaustein *et al.*, 2017).

As plantas hospedam uma grande diversidade de microrganismos, tanto dentro como

fora dos seus tecidos (Vandenkoornhuysen *et al.*, 2015). Os microrganismos endófitos são principalmente bactérias e fungos capazes de colonizar os tecidos internos da planta, sem prejudicar a planta hospedeira. Podem ser isolados de diversas partes de plantas, desinfetadas na superfície, ou dos tecidos internos da planta (Azevedo *et al.*, 2016). Apresentam um papel importante na promoção do crescimento das plantas, na proteção contra patógenos e na produtividade de um ecossistema agrícola (Vandana *et al.*, 2021; Azevedo *et al.*, 2016). Uma vez que são ubíquos em plantas e colonizam um nicho ecológico semelhante ao de alguns fitopatógenos, a sua modulação e manipulação tem vindo a ser proposta como uma ferramenta alternativa para controlar patógenos de plantas e melhorar o rendimento de culturas (Hanani *et al.*, 2022; Vandana *et al.*, 2021).

O papel central da microbiota vegetal é determinante na manutenção do *fitness* (saúde e equilíbrio) do hospedeiro, sendo esta essencial para o crescimento e a sobrevivência das plantas (Vergine *et al.*, 2020; Vandenkoornhuysen *et al.*, 2015). A diversidade microbiana está associada à saúde e produtividade das plantas. No entanto, pouco se sabe sobre o papel do microbioma nas plantas, havendo evidências que suportam que o microbioma é específico da espécie, e que cada habitat apresenta o seu próprio microbioma (Vergine *et al.*, 2020). De facto, as interações entre endófitos e plantas podem promover a saúde destas e desempenhar um papel significativo na agricultura sustentável (Azevedo *et al.*, 2016).

Atualmente, a procura de alternativas para uma agricultura sustentável é uma estratégia prioritária para o controlo de muitas doenças das plantas. No entanto, a compreensão dos mecanismos que permitem que os endófitos interajam com as plantas é essencial para perceber o potencial biotecnológico desses microrganismos (Azevedo *et al.*, 2016). Deste modo, é essencial estudar a diversidade da comunidade microbiana endófitas e as interações entre endófitos e plantas (Vandana *et al.*, 2021; Azevedo *et al.*, 2016).

#### **1.4 Técnicas de Sequenciação**

Para identificar a comunidade microbiana endófitas podem ser utilizadas técnicas dependentes ou independentes de cultivo. No segundo caso, recorre-se a técnicas de sequenciação que permitem determinar a sequência de bases nucleotídicas numa determinada molécula de DNA ou RNA (Grada & Weinbrecht, 2013). A sequenciação de ácidos nucleicos tornou-se fundamental na biologia molecular e nos campos clínicos (Liefting *et al.*, 2021), tendo sido também amplamente utilizada no diagnóstico e prognóstico de doenças (Zhong *et al.*, 2021).

O método de Sanger, também conhecido como o método da terminação em cadeia, desenvolvido por Frederick Sanger e colaboradores, em 1977, é considerado uma tecnologia de sequenciação de primeira geração (Lin *et al.*, 2021; Pareek *et al.*, 2011). A

sequenciação de Sanger usa nucleótidos de terminação de cadeia específicos, os dideoxinucleótidos (ddNTPs). Estes nucleótidos não possuem o grupo OH na posição 3' da pentose, necessário para a extensão das cadeias de DNA. Assim, uma vez incorporados os ddNTPs, ocorre um impedimento da extensão promovida pela DNA polimerase, não havendo por isso a formação de uma nova ligação fosfodiéster, o que resulta na terminação da síntese da cadeia de DNA. Os ddNTPs são marcados com radioisótopos ou com fluoróforos específicos para cada nucleótido, para posterior detecção e análise (Slatko *et al.*, 2018; Heather & Chain, 2016).

A tecnologia de sequenciação de DNA foi alvo de importantes avanços, no entanto, embora a metodologia desenvolvida por Sanger tenha sido fulcral no desenvolvimento da sequenciação, ao longo dos anos foi sofrendo diversas modificações e adaptações (Moreno, 2013), o que levou ao surgimento de novos métodos de sequenciação designados por *Next-Generation Sequencing* (NGS). Estas novas plataformas permitem a sequenciação simultânea de milhões de seqüências de DNA ou RNA, de forma mais rápida e económica quando comparados com o método de Sanger (Fujiyoshi *et al.*, 2020; Grada *et al.*, 2013).

O 454 *Life Sciences*, originou a primeira plataforma de sequenciação massiva de nova geração e a segunda geração de sequenciação, em 2005, conhecido como pirosequenciação. Esta técnica permite que várias amostras e genes sejam sequenciados ao mesmo tempo (Serrano, 2014), e baseia-se na detecção de pirofosfato libertado durante a síntese de DNA, onde é gerada uma luz visível (Heather & Chain, 2016). Esta tecnologia envolve a criação de uma biblioteca de fragmentos de DNA, cuja é submetida a uma amplificação em massa por PCR de emulsão, sobre a superfície de diversas *beads* de agarose (Serrano, 2014).

Em 2007, surge a sequenciação *Illumina*, semelhante ao método de Sanger, no entanto utiliza nucleótidos terminadores reversíveis marcados com um corante fluorescente, específico para cada nucleótido que, uma vez incorporado na cadeia de DNA, previne a incorporação de mais nucleótidos (Zhong *et al.*, 2021; Pareek *et al.*, 2011). Apresenta uma capacidade de sequenciar 36-300 pb (Goldfeder *et al.*, 2017).

Uma nova metodologia, o *Ion Torrent*, surge em 2010, apresentando uma capacidade de sequenciar 200-400 pb (Goldfeder *et al.*, 2017). É uma técnica de sequenciação de DNA baseada na detecção de iões hidrogénio, que deteta a libertação de prótons após a incorporação de nucleótidos durante a síntese de DNA, gerando assim alterações de pH (Zhong *et al.*, 2021).

Posteriormente, surgiu a terceira geração de sequenciação, que possui uma capacidade de sequenciar aproximadamente 250 000 pb, em tempo real (Goldfeder *et al.*, 2017). Esta geração não requer amplificação e oferece leituras muito mais longas quando comparados com tecnologias de sequenciação de segunda geração (Zhong *et al.*, 2021). A introdução do sequenciador de alto rendimento *Pacific Biosciences (Pac Bio)* facilitou a análise estrutural de comunidades microbianas, através da tecnologia de sequenciação SMRT (*Single Molecule Real Time*) que possibilita, pela primeira vez, sequenciar em tempo real uma única molécula (Fujiyoshi *et al.*, 2020; Moreno, 2013).

Em 2014, foi desenvolvida uma nova tecnologia de sequenciação de DNA, a sequenciação por nanoporos comercializado pela *Oxford Nanopore Technologies (ONT)* (Fujiyoshi *et al.*, 2020).

#### **1.4.1 Sequenciação por nanoporos**

Em comparação com outras técnicas de sequenciação que utilizam marcação ou incorporação de nucleótidos (Zhong *et al.*, 2021), a sequenciação ONT sequencia diretamente uma molécula através da passagem por nanoporos (Weirather *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2021). Existem três formas de sequenciação por nanoporos, 1D, 2D e 1D<sup>2</sup>. A 1D usa nanoporos onde apenas uma cadeia de DNA é sequenciada. A sequenciação 2D utiliza uma estrutura *hairpin* numa das extremidades do DNA permitindo a leitura de ambas as cadeias. Por fim, a 1D<sup>2</sup> permite a sequenciação de uma cadeia de DNA, seguida pela sequenciação da cadeia complementar, o que permite aumentar a precisão das leituras (Lin *et al.*, 2021).

A sequenciação por nanoporos envolve uma membrana fina imersa numa solução salina, com elevada resistência elétrica, que contém poros com aproximadamente 1,5 – 2 nm de diâmetro (McGinn & Gut, 2013; Gupta, 2008). É aplicada uma corrente elétrica que conduz as moléculas de DNA a passar pelos nanoporos, provocando uma mudança de potencial. À medida que os nucleótidos passam pelo nanoporo, bloqueiam o fluxo de iões, diminuindo a corrente por um período de tempo proporcional ao comprimento do ácido nucleico (Heather & Chain, 2016), ou seja, moléculas de diferentes tamanhos vão bloquear o poro de forma diferente e durante espaços de tempo diferentes, possibilitando a distinção entre as quatro bases de DNA (T, G, C e A) e assim a identificação da sequência (McGinn & Gut, 2013). Durante a preparação da biblioteca, ocorre o emparelhamento do DNA de cadeia dupla com a enzima helicase, que tem como objetivo separar ambas as cadeias, permitindo apenas a passagem de uma única cadeia através do poro (Figura 3) (Sutton *et al.*, 2019; Leggett & Clark, 2017). Numa célula de fluxo *MinION* há uma matriz com 512 sensores, cada um conectado a quatro nanoporos, podendo ser utilizado a qualquer momento milhares de vezes por segundo. Cada um dos

512 canais pode estar em vários estados diferentes dependendo se as moléculas estão a ser sequenciadas, capturadas no poro ou se os poros estão vazios ou bloqueados (Leggett & Clark, 2017).

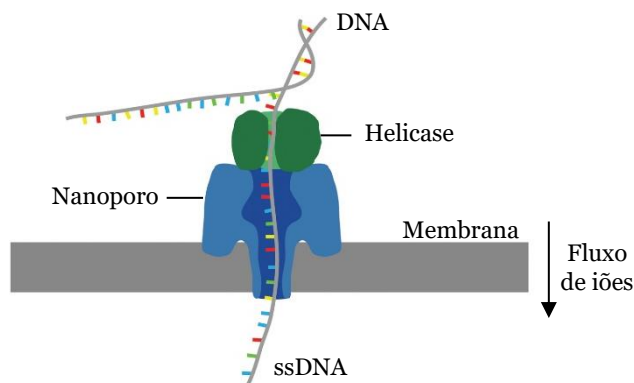


Figura 3. Representação esquemática da sequenciação por nanoporos, adaptado de Leggett & Clark, 2017.

Os nanoporos são os principais componentes deste tipo de sequenciação, sendo por isso essencial o conhecimento das suas características físicas e químicas. Existem três tipos de nanoporos, os biológicos, os de estado sólido e os híbridos (Wasfi *et al.*, 2018). Os nanoporos biológicos são normalmente colocados numa membrana lipídica como proteína transmembranar (Lamb *et al.*, 2020; Slatko *et al.*, 2018), sendo a  $\alpha$ -hemolisina normalmente a mais utilizada em sequenciações ONT. Esta proteína geralmente forma um nanoporo cilíndrico e apresenta um diâmetro de aproximadamente 1,5 nm, que permite a passagem de RNA ou DNA de cadeia simples (ssDNA) (Wasfi *et al.*, 2018; Farzin *et al.*, 2013). As vantagens do uso de nanoporos biológicos incluem a sua estabilidade térmica, a possibilidade de serem facilmente modificados e poderem ser produzidos em grandes quantidades, sem alterar o seu tamanho e estrutura (McGinn & Gut, 2013). Uma membrana proteica alternativa é a MspA de *Mycobacterium smegmatis*, esta porina com diâmetro de 1 nm apresenta melhor estabilidade do que a  $\alpha$ -hemolisina (Slatko *et al.*, 2018). Os nanoporos de  $\alpha$ -hemolisina e MspA são pequenos canais que permitem a passagem de DNA ou RNA de cadeia simples, já o Phi29, outro tipo de nanoporo biológico, foi proposto para detetar DNA de cadeia dupla (dsDNA), com um canal de diâmetro aproximado de 3,6 nm, diâmetro este que oferece melhor flexibilidade para modificações bioquímicas (Wasfi *et al.*, 2018).

Os nanoporos artificiais de estado sólido são estruturas com um orifício à escala nanométrica formulados numa membrana sintética de sílica ou derivados. Apesar deste tipo de nanoporo ter a possibilidade de ser produzido de várias formas, os nanoporos biológicos são mais estáveis termicamente, pelo que são ainda necessárias várias

melhorias para alcançar bons resultados na sequenciação de DNA através do uso de nanoporos de estado sólido (Wasfi *et al.*, 2018; Moreno, 2013).

De forma a superar as limitações dos nanoporos biológicos e artificiais, foram combinadas as melhores características de ambos. Assim, os nanoporos híbridos reúnem a durabilidade de um nanoporo de estado sólido com a estrutura precisa de um nanoporo biológico (Wasfi *et al.*, 2018; Sen *et al.*, 2021). Contudo, tal como os nanoporos artificiais, os nanoporos híbridos devem ser aprimorados para obter sucesso na sequenciação (Wasfi *et al.*, 2018).

Em 2014, foi lançado o primeiro dispositivo disponível para sequenciação por nanoporos, o *MinION*, este é um sequenciador portátil com 105 mm x 23 mm x 33 mm (McCabe *et al.*, 2018) alimentado por USB (Reuter *et al.*, 2015). Recentemente, foi lançado o *MinION MK1C* que combina o sequenciador *MinION* com um computador de alto desempenho. O *MinION* e o *MinION MK1C* são, até ao momento, as únicas plataformas de sequenciação portáteis no mercado, o que confere uma vantagem significativa relativamente a outras plataformas de sequenciação de terceira geração (Lamb *et al.*, 2020). Entretanto, a ONT já lançou outras plataformas de sequenciação que usam a mesma tecnologia subjacente como o *GridION* e o *PromethION*, que fornecem maior rendimento, produzindo 75–150 Gbp e 2,4–4,3 Tbp, respetivamente (Figura 4). Além disso, o *Flongle* é uma célula de fluxo compatível com o *MinION* e o *GridION*, projetado para testes e experiências menores onde não é necessário alto rendimento, fornecendo uma alternativa mais barata às células de fluxo tradicionais (Lamb *et al.*, 2020).

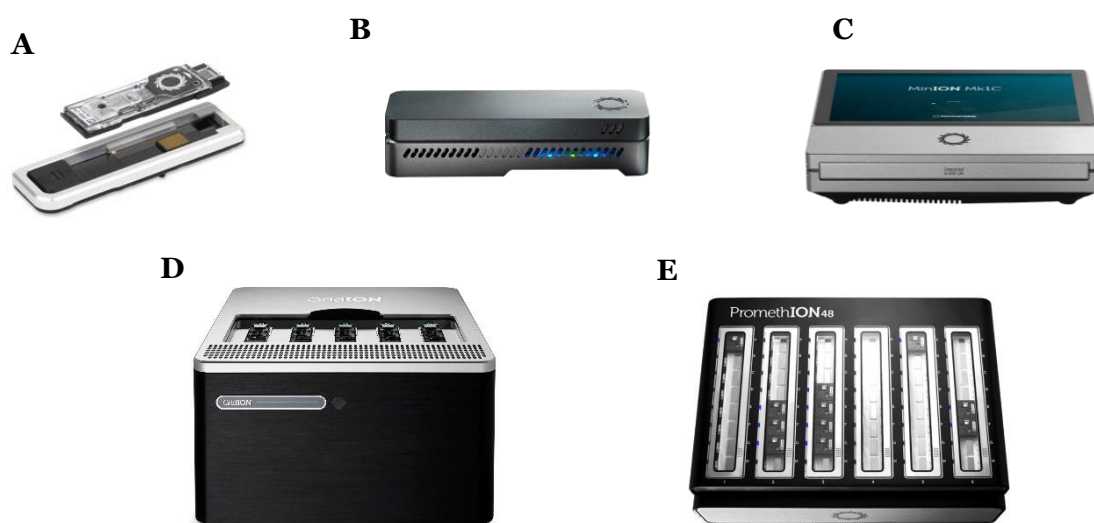


Figura 4. Dispositivos da ONT disponíveis no mercado (Oxford Nanopore Technologies, 2022a). A – Flongle, B – *MinION*, C – *MinION MK1C*, D – *GridION* e E – *PromethION*.

A sequenciação por nanoporos tornou-se numa das tecnologias de sequenciação mais poderosas (Lin *et al.*, 2021), tendo feito progressos significativos nos últimos anos (Reuter *et al.*, 2015). Desde o lançamento, a ONT pretende melhorar continuamente a precisão da sua plataforma de sequenciação, combinando novas químicas de sequenciação com algoritmos de análise de dados em constante evolução. Desta forma, recentemente, foi desenvolvida uma nova química Q20+ que permite alcançar uma precisão de sequenciação de 99% ou mais (Oxford Nanopore Technologies, 2022b). Esta tecnologia combina a sequenciação em tempo real, rápida e portátil, com uma computação poderosa integrada. Apresenta baixa complexidade e baixo custo, no entanto, a sua principal vantagem é o facto de fornecer comprimentos de leitura bastante longos, podendo atingir os 250 000 pb (Cummings *et al.*, 2017; Goldfeder *et al.*, 2017). A preparação da biblioteca é um processo simples e rápido, e permite analisar várias amostras simultaneamente com a ligação de *barcodes* (Cummings *et al.*, 2017). Por outro lado, em comparação com outras técnicas de sequenciação, existem menos ferramentas e protocolos de bioinformática direccionados especificamente para a análise de 16S rRNA (Pavlovic *et al.*, 2021).



## **Capítulo 2 – Objetivos**



O presente trabalho teve como objetivos caracterizar a diversidade estrutural de microrganismos endófitos em espécies de plantas silvestres suscetíveis à infecção por *Xylella fastidiosa* (*Xf*) presentes na zona de foco em Portugal, com a finalidade de identificar possíveis grupos taxonómicos que modulem a infecção ou que estejam envolvidos na disbiose. Adicionalmente, foi ainda objetivo identificar a subespécie de *Xf* presente em Portugal de forma a caracterizar epidemiologicamente a doença.



## **Capítulo 3 – Materiais e Métodos**



### 3.1 Colheita

As amostras foram colhidas durante o mês de fevereiro em vários concelhos da área metropolitana do Porto. Foram selecionadas amostras vegetais de diferentes espécies, sem sintomas aparentes da doença causada por *Xf* (Tabela 1).

As amostras colhidas foram armazenadas em sacos de plástico estéreis, rotuladas e transportadas para o laboratório no frio, onde foram processadas.

Tabela 1. Informações sobre a localização, espécie e data de colheita das amostras.

Localização	Espécie	Data de colheita
	<i>Adenocarpus</i> sp.	
Vila Nova de Gaia	<i>Lavandula dentata</i>	07/02/2022
	<i>Dimorphoteca</i>	
Santa Maria da Feira	<i>Gazania</i> sp.	
Espinho	<i>Quercus robur</i>	
	<i>Quercus robur</i>	
Vila Nova de Gaia	<i>Ulex</i> sp.	14/02/2022
	<i>Quercus suber</i>	
Gondomar	<i>Cytisus scoparius</i>	
	<i>Quercus suber</i>	

### **3.2 Esterilização da superfície e isolamento de *Xf***

Foram selecionadas aleatoriamente folhas e ramos representativos de toda a amostra vegetal. As folhas e os ramos foram processados e submetidos a um procedimento de esterilização superficial, tal como descrito por Figueira *et al.*, 2020. Resumidamente, o material vegetal foi imerso em etanol 70% durante 1 minuto e meio, seguido de imersão em hipoclorito de sódio (NaClO 1%) durante 3 minutos, novamente imerso em etanol 70% durante 1 minuto e meio e, por fim, enxaguado com água estéril duas vezes durante 6 minutos. Após este processo de desinfecção superficial do material vegetal, as amostras foram secas com papel de filtro estéril e maceradas em tampão fosfato salino (PBS) recorrendo a um homogeneizador (*Homex 6*), obtendo-se assim o extrato da planta. Todas as amostras foram processadas independentemente, em condições assépticas. Os extratos obtidos foram diluídos em série até à diluição de  $10^{-3}$  para folhas e até  $10^{-2}$  para ramos. Alíquotas de 100  $\mu$ L foram plaqueadas em meio BCYE e PWG. Foram também realizados *printings* das folhas e dos ramos de cada amostra vegetal em meio BCYE e PWG. As placas foram incubadas a 28°C de forma a favorecer o crescimento da bactéria (EPPO, 2019).

### **3.3 Extração de DNA total de amostras vegetais**

A extração do DNA das amostras vegetais foi realizada de acordo com o método de extração *Cetyltrimethylammonium Bromide* (CTAB) a 4% (EPPO, 2019). Para a extração do DNA, foram transferidos 0,75 mL de extrato para um microtubo contendo 0,75 mL de CTAB a 4%. O extrato foi aquecido a 65°C durante 30 minutos e centrifugado (5 minutos a 16 000g). Após lise celular, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e homogeneizado com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), com a finalidade de desnaturar as proteínas, obtendo-se uma separação entre a fase aquosa e a fase orgânica. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e homogeneizado por inversão com 2-propanol a 4°C e incubado *overnight* a -20°C. Posteriormente, a amostra foi centrifugada durante 20 minutos a 16 000 g o que permitiu a recuperação de um precipitado. Este foi lavado com etanol a 70% e novamente centrifugada durante 10 minutos a 16 000 g. O sobrenadante foi descartado e lavado novamente. Por fim, o DNA foi seco dentro da câmara de fluxo e ressuspenso em água ultrapura estéril. O DNA extraído de cada amostra foi quantificado por espectrofotometria (*Biotek Epoch 2*).

### 3.4 Identificação bacteriana

A detecção molecular de *Xf* foi realizada através de dois protocolos de PCR em tempo real que amplificam regiões distintas do genoma da bactéria. A detecção foi efetuada de acordo com os métodos de Harper *et al.* (2010) e Ouyang *et al.* (2013), descritos na norma EPPO (2019).

Para cada extração foi realizado um controlo interno positivo, baseado na amplificação do gene citocromo oxidase (COX) (Weller *et al.*, 2000). Este procedimento teve como objetivo avaliar a qualidade da extração do DNA e a presença de inibidores de modo a limitar a possibilidade de falsos negativos no PCR. Por cada amostra a analisar e por cada um dos métodos analisados prepararam-se duas reações de PCR em tempo real, uma com o DNA total extraído e outra com a sua diluição de 1:50. Assim, em condições estéreis, para cada reação realizou-se uma mistura de reação com a concentração final e os reagentes constantes na tabela 2 às quais foi posteriormente adicionado o DNA total ou a sua diluição. Paralelamente, foi preparado um Controlo Positivo de Amplificação (PAC) com adição de DNA extraído de uma estirpe de referência de *Xf*, e um Controlo Negativo de Amplificação (NAC) no qual o volume de DNA foi substituído pelo mesmo volume de água estéril.

Tabela 2. Mistura para as reações de PCR em tempo real (EPPO, 2019).

	<b>COX (Weller <i>et al.</i>, 2000)</b>	<b>Harper <i>et al.</i>, 2010</b>	<b>Ouyang <i>et al.</i>, 2013</b>
<b>Reagentes</b>	Água estéril	Água estéril	Água estéril
	1 x NZYSpeedy qPCR Probe Master Mix	1 x NZYSpeedy qPCR Probe Master Mix	1 x PerfeCTa qPCR ToughMix
	0.9 µM Forward primer (COX-F)	0.3 µM Forward primer (XF-F)	0.3 µM Forward primer ( <i>Xf</i> . Csp6F)
	0.9 µM Reverse primer (COX-R)	0.3 µM Reverse primer (XF-R)	0.3 µM Reverse primer ( <i>Xf</i> . Csp6R)
	0.2 µM Sonda (COX-P)	0.1 µM Sonda (XF-P)	0.1 µM Sonda ( <i>Xf</i> . Csp6P)
		0.3 µg µL <sup>-1</sup> BSA	

Todos os ensaios de PCR em tempo real foram realizados no termociclador *Bio-Rad CFX-96 (Bio-Rad Laboratories)*, utilizando placas de 96 poços e seguindo as condições ótimas de amplificação constantes na tabela 3.

Tabela 3. Sequências de *primers* e condições para as reações de PCR em tempo real (EPPO, 2019).

	<b>Sequência primers</b>	<b>Condições de PCR</b>	<b>Referência</b>
<b>COX</b>	COX-F ( <i>Forward</i> )	5'-CGT CGC ATT CCA GAT TAT CCA-3'	Weller <i>et al.</i> , 2000
	COX-R ( <i>Reverse</i> )	5'-CAA CTA CGG ATA TAT AAG RRC CRR AAC TG-3'	
	XF-P (Fluoróforo HEX)	5'-[HEX] TGC TTA CGC TGG ATG GAA TGC CCT [BHQ1] -3'	
		50°C 2 min 95°C 10 min 95°C 15 min } 45 ciclos 60°C 1 min }	
<b>Harper</b>	XF-F ( <i>Forward</i> )	5'-CAC GGC TGG TAA CGG AAG A-3'	Harper <i>et al.</i> , 2010
	XF-R ( <i>Reverse</i> )	5'-GGG TTG CGT GGT GAA ATC AAG-3'	
	XF-P (Fluoróforo FAM)	5'-6-FAM-TCG CAT CCC GTG GCT CAG TCC [BHQ1]-3'	
		95°C 10 min 94°C 10 s } 40 ciclos 62°C 40 s }	
<b>Ouyang</b>	<i>Xf.Csp6F</i> ( <i>Forward</i> )	5'-CCC ATT ACG CTT CAA CCA TT-3'	Ouyang <i>et al.</i> , 2013
	<i>Xf.Csp6R</i> ( <i>Reverse</i> )	5'-CCC AAT CCA TAC GAC TTG CT-3'	
	<i>Xf.Csp6P</i> (Fluoróforo FAM)	5'-6-FAM-GGT GTG ATT [ZEN] CGC AGC AAG GGC-IBFQ-3'	
		95°C 10 min 95°C 15 s } 40 ciclos 60°C 60 s }	

### 3.5 Análise *Multilocus Sequence Typing* (MLST)

A análise MLST foi realizada de acordo com o protocolo descrito pela norma EPPO (2019), em 12 amostras vegetais de diferentes hospedeiros em que foi detetada a presença de *Xf*, nomeadamente *Adenocarpus* sp., *Dimorphoteca*, *Gazania* sp., *Cytisus scoparius*, *Lavandula dentata*, *Ulex* sp., *Quercus suber*, *Ruta graveolens*, *Osteopermum fruticosum*, *Quercus robur*, *Frangula alnus* e *Pterospartum tridentatum*. Este esquema aplicado à *Xf* inclui a amplificação parcial de sete genes *housekeeping*: *leuA*, *petC*, *malF*, *cysG*, *holC*, *nuoL* e *gltT* (Tabela 4).

Tabela 4. Sequências de *primers* e tamanho do amplificado dos sete genes *housekeeping* usados na análise MLST (*leuA*, *petC*, *malF*, *cysG*, *holC*, *nuoL* e *gltT*) (EPPO, 2019; Jolley *et al.*, 2018).

<b>Genes</b>	<b>Forward Primer</b>	<b>Reverse Primer</b>	<b>Amplificado (pb)<sup>a</sup></b>
<i>leuA</i>	5' -GGTGCACGCCAAATCGAATG-3'	5' -GTATCGTTGTGGCGTACACTG-3'	708
<i>petC</i>	5' -GCTGCCATTCGTTGAAGTACCT-3'	5' -GCACGTCCTCCCAATAAGCCT-3'	533
<i>malF</i>	5' -TTGCTGGTCTCGGTTGTTG-3'	5' -GACAGCAGAAGCACGTCCCAGAT-3'	730
<i>cysG</i>	5' -GCCGAAGCAGTGCTGGAAG-3'	5' -GCCATTTTCGATCAGTGCAAAAAG-3'	600
<i>holC</i>	5' -ATGGCACGCGCCACTTCT-3'	5' -ATGTCGTGTTTGTTCATGTGCAGG-3'	379
<i>nuoL</i>	5' -TAGCGACTTACGGTACTGGGC-3'	5' -ACCACCGATCCACAACGCAT-3'	557
<i>gltT</i>	5' -TCATGATCCAAATCACTCGCTT-3'	5' -ACTGGACGCTGCCTCGTAAACC-3'	654

<sup>a</sup> Tamanho do amplificado com *primers* removidos

As reações de amplificação foram realizadas individualmente para cada gene. Para cada reação realizou-se uma mistura com os reagentes constantes na tabela 5 às quais foi adicionado o DNA total.

Tabela 5. Mistura para as reações de PCR para análise MLST (EPPO, 2019).

Reagentes	Concentração final
Água ultrapura	-
PCR buffer (Invitrogen)	1 ×
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
BSA	0.3 µg µL <sup>-1</sup>
dNTPs	0.2 mM
Primer forward ( <i>leuA-F/petC-F/malF-F/cysG-F/holC-F/nuoL-F/gltT-F</i> )	0.3 µM
Primer reverse ( <i>leuA-R/petC-R/malF-R/cysG-R/holC-R/nuoL-R/gltT-R</i> )	0.3 µM
DNA Polymerase Platinum (Invitrogen)	0.03 U µL <sup>-1</sup>

As condições de PCR foram as seguintes: 95°C durante 3 min, seguido por 35 ciclos de (95°C durante 30 s, 65°C durante 30s e 72°C durante 60 s) e uma etapa de extensão final a 72°C por 10 min.

### 3.5.1 Análise dos produtos de amplificação

O sucesso das reações de amplificação foi verificado por eletroforese em gel de agarose (NZYTech) 1% (w/v) em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) (1%). O gel foi corado com *GreenSafe Premium* (NZYTech) e o marcador utilizado foi de 200 – 10 000 pb (NZYDNA Ladder III, NZYTech). Os produtos de PCR foram sujeitos a uma corrente de 70 V durante 40 minutos e foram visualizados com *Molecular Imager Doc™ XR+* (Bio-Rad).

### 3.5.2 Purificação dos produtos de PCR

Após a confirmação do tamanho dos produtos de amplificação, estes foram purificados usando o *kit* de purificação *GRS PCR & Gel Band* (Grisp), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, foi excisada a banda do gel de agarose que continha o fragmento de DNA de interesse identificado pelo seu peso molecular. Foram transferidos cerca de 300 mg da banda do gel para um microtubo e adicionados 500 µL de solução de solubilização em gel. De forma a dissolver completamente a banda, o microtubo foi aquecido a 60°C e foram transferidos 800 µL da mistura da amostra para uma coluna. De seguida, foram realizadas duas etapas de lavagem com tampão de lavagem contendo etanol, para remover impurezas. Por fim, realizou-se um passo de centrifugação adicional para secar a membrana. Os fragmentos de DNA foram eluídos com 35 µL de água estéril aquecida (60°C), novamente centrifugados e o DNA foi armazenado a -20°C.

### 3.5.3 Sequenciação dos produtos de amplificação

Os produtos de amplificação purificados de cada um dos sete genes *housekeeping* foram sequenciados pela nova tecnologia de sequenciação por nanoporos, *Oxford Nanopore Technologies* (ONT). A biblioteca de sequenciação de DNA por nanoporos foi preparada de acordo com o protocolo *Native Barcoding Genomic DNA* usando o kit SQK-LSK109 e EXP-NBD104, com algumas alterações para otimização do protocolo. A sequenciação foi realizada num dispositivo *MinION Mk1C*, numa célula de fluxo R9.4.1 (ONT).

O protocolo de sequenciação inclui o passo de *end-prep*, ligação do *barcode*, ligação do adaptador e limpeza, e por fim, preparação e carregamento na célula de fluxo. De acordo com as instruções do fabricante, o ensaio deve iniciar com 1 µg de DNA em água livre de nucleases para um volume final de 50 µL. Contudo, uma vez que não havia volume suficiente para ter 1 µg de DNA, foi realizada para cada amostra uma mistura com os sete genes, com diferentes quantidades e foram colocadas no *Concentrator Plus* (*Eppendorf*) para concentrar a amostra e reduzir o volume até, pelo menos, 50 µL.

A biblioteca de sequenciação necessita de uma preparação das extremidades do DNA para posterior ligação do adaptador. Deste modo, foram adicionados 7 µL de *Ultra II end-prep reaction buffer* (*New England Biolabs*) e 3 µL de *Ultra II end-prep enzyme mix* (*New England Biolabs*). Cada reação foi submetida a um passo de incubação a 20°C durante 20 minutos e, de seguida, a 65°C durante o mesmo período de tempo, para posterior adição de 90 µL de *AMPure XP beads* (*Beckman Coulter*), com a finalidade de limpar e purificar as amostras de DNA. Após uma incubação durante cerca de 10 minutos à temperatura ambiente, os microtubos foram colocados no suporte magnético até o sobrenadante ficar completamente límpido. Este foi descartado e foram realizadas duas lavagens com 200 µL de etanol a 70%. Depois das amostras estarem secas, o precipitado foi homogeneizado em 40 µL de água livre de nucleases e foi quantificado 1 µL de cada amostra no fluorómetro *Qubit* (*Invitrogen*).

Para o segundo passo de ligação do *barcode*, de forma a obter 500 ng por amostra, estas foram novamente colocadas no *Concentrator Plus*, para reduzir o volume até aproximadamente 22,5 µL. De forma sequencial, foram adicionados 2,5 µL de *barcodes* para identificação das amostras e 25 µL da *Blunt/TA ligase Master Mix* (*New England Biolabs*). Depois das reações terem incubado durante 10 minutos, foram adicionados 75 µL de *AMPure XP beads*. Realizaram-se novamente duas lavagens com etanol a 70% e o precipitado foi homogeneizado em 40 µL de água livre de nucleases. Por fim, fez-se uma mistura num novo microtubo com as 12 amostras e foi novamente quantificado 1 µL no *Qubit*. De forma a obter a concentração final de 700 ng, a amostra foi diluída em água livre de nucleases até ao volume de 65 µL.

No terceiro passo de ligação do adaptador, aos 65 µL de amostra, foram adicionados sequencialmente 5 µL de *Adapter Mix II*, 20 µL de *NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer (5x)* (*New England Biolabs*) e 10 µL de *Quick T4 Ligase* (*New England Biolabs*). A ligação ocorreu durante alguns minutos e o DNA foi eluído em 15 µL de *Elution Buffer* após ter sido purificado com 50 µL de *AMPure XP beads* e lavado com 250 µL de *Short fragment buffer* (o desejado para fragmentos mais pequenos). Por fim, foi quantificado 1 µL da reação no fluorómetro *Qubit*.

No último passo da preparação da biblioteca, procedeu-se à preparação e carregamento da célula de fluxo. Foram selecionados os parâmetros de execução e as amostras foram sequenciadas durante aproximadamente 14 horas.

### 3.6 Amplificação do gene 16S rRNA

Um dos problemas enfrentados para se caracterizar eficientemente comunidades bacterianas associadas a plantas, é a co-amplificação das sequências de cloroplastos e mitocôndrias da própria planta hospedeira com o 16S rRNA bacteriano. Uma das recentes abordagens para evitar esse problema é a utilização de *primers* bloqueadores, como por exemplo, o polímero de ácido nucleico (PNA), que se liga ao DNA dos cloroplastos (pPNA: 5'-GGCTCAACCCTGGACAG-3') e das mitocôndrias (mPNA: 5'-GGCAAGTGTTCCTCGGA-3') (Fouz & Apella, 2020; Fitzpatrick *et al.*, 2018). O PNA não é reconhecido como um *primer* pela DNA polimerase na amplificação, impedindo desta forma que ocorra amplificação destas sequências (Fouz & Apella, 2020).

A amplificação do gene 16S rRNA foi realizado em 12 amostras vegetais, cinco amostras em que *Xf* foi detetada por PCR em tempo real e sete em que *Xf* não foi detetada. A amplificação foi executada usando o par de *primers* 27F e 1525R, específicos para o gene 16S rRNA (Tabela 6).

Tabela 6. Sequência dos *primers* usados para amplificação do gene 16S rRNA.

<b>Primers</b>	<b>Sequência de primers</b>	<b>Referência</b>
<b>27F</b>	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	Rozas et al., 2022
<b>1525R</b>	5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'	Rozas et al., 2022

As reações de amplificação foram realizadas em condições estéreis. Para cada reação realizou-se uma mistura com o DNA e os reagentes constantes na tabela 7.

Tabela 7. Mistura para as reações de PCR para amplificação do gene 16S rRNA com a enzima *NZYTaq II 2x Green Master Mix*.

Reagentes	Concentração final
Água ultrapura	-
<i>Primer forward</i> (27F)	0.2 µM
<i>Primer reverse</i> (1525R)	0.2 µM
mPNA	0.25 µM
pPNA	0.25 µM
<i>NZYTaq II 2x Green Master Mix</i>	0.2 U/µL

Foram usadas duas enzimas diferentes para a amplificação do gene 16S rRNA. Em duas amostras difíceis de amplificar com a enzima *NZYTaq II 2x Green Master Mix* (NZYTech), a reação de amplificação foi realizada com a enzima *Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs). Posto isto, para a amplificação foi efetuada uma mistura com o DNA e os reagentes constantes na tabela 8.

Tabela 8. Mistura para as reações de PCR para amplificação do gene 16S rRNA com a enzima *Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase*.

Reagentes	Concentração final
Água ultrapura	-
5× Q5 Reaction Buffer	1 ×
5×Q5 <i>High GC Enhancer</i>	1 ×
dNTPs	10 mM
<i>Primer forward</i> (27F)	0.4 µM
<i>Primer reverse</i> (1525R)	0.4 µM
mPNA	0.25 µM
pPNA	0.25 µM
<i>Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase</i>	0.02 U/µL

As condições de PCR usadas para todas as reações foram as seguintes: etapa inicial de desnaturação a 98°C durante 30s, seguido por 30 ciclos a 98°C durante 10s, um passo adicional de PNA *clamping* a 75°C durante 10 s, 60 °C durante 30 s e 72°C durante 90 s. Por fim, a extensão final a 72°C durante 2 min.

### **3.6.1. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação**

Para confirmar a amplificação do DNA foi realizada a técnica de eletroforese em gel de agarose 1% (w/v) em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) (1%). O gel foi corado com *GreenSafe Premium* (NZYTech) e o marcador utilizado foi de 200 – 10 000 pb (NZYDNA Ladder III, NZYTech). Para a análise dos produtos de PCR, foram utilizados 5 µL de cada reação. Estes foram aplicados ao gel de agarose e sujeitos a uma corrente de 80V durante 30 minutos. Os produtos de PCR separados por eletroforese horizontal foram visualizados e analisados com *Genoplex* (VWR).

### **3.6.2. Purificação dos produtos de PCR**

A enzima NZYTaq II 2x *Green Master Mix* possui dois corantes (azul e amarelo), que permitem monitorizar a migração da eletroforese, pelo que, as reações efetuadas com esta enzima podem ser carregadas diretamente em géis de agarose. Desta forma, após o carregamento das amostras no gel, os produtos de PCR foram purificados usando o *kit NZYGelpure* (NZYTech), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, o volume da reação foi transferido para um microtubo e foram adicionados cinco volumes de *Binding Buffer*. Os microtubos foram invertidos e centrifugados. A mistura foi adicionada a uma coluna, novamente centrifugada e, de seguida, foi realizada uma etapa de lavagem com *Wash Buffer*, com a finalidade de remover impurezas. Por fim, após centrifugações para secar a membrana, o DNA foi eluído com 50 µl de água ultrapura.

### **3.6.3 Sequenciação do gene 16S rRNA**

À semelhança do protocolo descrito anteriormente para a sequenciação dos fragmentos para análise MLST, os produtos obtidos da amplificação do gene 16S rRNA foram sequenciados usando a mesma tecnologia. Contudo, há algumas alterações ao protocolo especificado. A biblioteca de sequenciação de DNA foi preparada de acordo com o protocolo *Native Barcoding Amplicons* usando o *kit SQK-LSK109* e *EXP-NBD10* (ONT). Para cada amostra foi preparado 1 µg de DNA em água livre de nucleases para um volume final de 48 µL. De seguida, foram adicionados 3,5 µL de *NEBNext FFPE DNA Repair Buffer* e 2 µL de *NEBNext FFPE DNA Repair Mix (New England Biolabs)*, para a reparação das extremidades do DNA, bem como 3,5 µL de *UltraII end-prep reaction buffer* e 3 µL de *UltraII end-prep enzyme mix* para posterior ligação do adaptador. Foram realizadas lavagens com 60 µL de *AMPure XP beads* e com etanol 70%. O precipitado foi homogeneizado em 25 µL de água livre de nucleases.

No segundo passo da preparação da biblioteca, pretendia-se diluir 100-200 fmol de cada amostra num volume de 22,5 µL. Fez-se de igual forma a ligação do *barcode*, sendo que, neste caso, a purificação e lavagem das amostras de DNA foram realizadas com 50 µL de *beads* e o precipitado foi homogeneizado em 26 µL de água livre de nucleases. De seguida, à semelhança do protocolo descrito anteriormente, fez-se uma mistura com as 12 amostras e esta foi quantificada.

No terceiro passo, ocorreu a ligação do adaptador, através da adição do *Adapter Mix*, *NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer* e *Quick T4 DNA Ligase*. A pool das amostras foi purificada novamente com *beads* e lavada com *Short fragment buffer*. Por fim, o DNA foi eluído com *Elution Buffer* e procedeu-se à preparação e carregamento da célula de fluxo. Foram seleccionados os parâmetros de execução e as amostras foram sequenciadas durante aproximadamente 16 horas.

### **3.7 Análise bioinformática**

A análise bioinformática dos MLST foi realizada com o *software BioEdit* versão 7.2.

Relativamente à análise bioinformática do gene 16S rRNA, os arquivos FASTQ foram submetidos na plataforma EPI2ME para análise taxonómica e interpretação de resultados. As sequências geradas foram analisadas pela plataforma em tempo real, resultando em 3,496,985 leituras. A identificação das sequências seguiu os seguintes parâmetros, *qscore* mínimo de 9, tamanho mínimo de 1300 pb e máximo de 1600 pb, filtro de BLAST *E-value* de 0,01 e de *coverage* de 85%, mínimo de identidade de 85% e número máximo de *hits* por sequência de 3.

EPI2ME é uma plataforma *online* desenvolvida pela ONT, onde fluxos *standard* de trabalhos são depositados para facilitar a visualização de dados ONT. A classificação taxonómica 16S, consiste na atribuição taxonómica utilizando o banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), que contém mais de 20.000 sequências do gene 16S rRNA de diferentes organismos e com base num limite de 85% de identidade (Oxford Nanopore Technologies, 2022c).

## **Capítulo 4 – Resultados e Discussão**



## 4.1 Isolamento de *Xf*

*Xf* é uma bactéria muito difícil de isolar e crescer em cultura axénica, mesmo a partir de plantas sintomáticas (Wells *et al.*, 1987). Apesar da utilização de meios específicos e enriquecidos (PWG e BCYE) para o crescimento *in vitro* de *Xf*, não foi possível observar o seu crescimento em meio sólido o que poderá estar associado à baixa concentração da bactéria nas plantas hospedeiras.

## 4.2 Detecção molecular de *Xf*

A deteção de *Xf* por PCR em tempo real foi realizada usando o DNA extraído dos pecíolos, folhas e ramos de doze espécies hospedeiras, sem sintomas aparentes de doença causada por *Xf*. O primeiro ensaio de amplificação foi um controlo interno de extração de DNA que visou verificar se a extração de DNA tinha sido bem-sucedida e aferir a sua qualidade. Perante os resultados da amplificação do gene COX, pode concluir-se que a extração do DNA correu conforme esperado, uma vez que se obtiveram amplificadores exponenciais para todas as amostras, o NAC não apresentou amplificação e o PAC apresentou uma curva de amplificação exponencial, o que indica uma boa qualidade de extração (Figura 5).

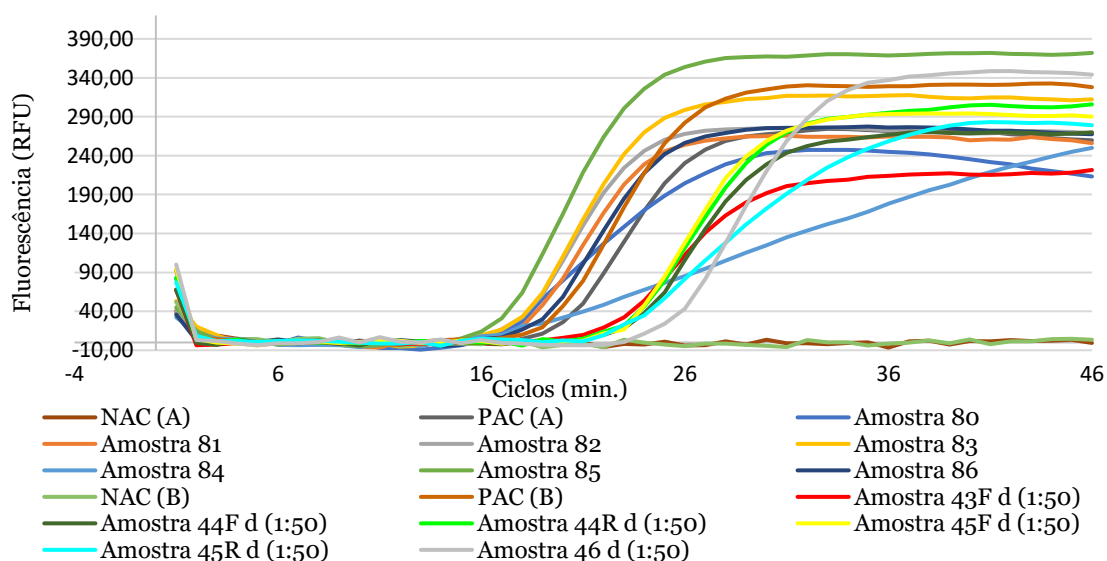


Figura 5. Controlo interno de extração de DNA para as amostras em análise.

NAC e PAC (A) – Controlo negativo e positivo, respetivamente, para as amostras 80 a 86;

NAC e PAC (B) – Controlo negativo e positivo, respetivamente, para as amostras 43F, 44F, 44R, 45F, 45R e 46.

As amostras apenas obtiveram amplificação na diluição de 1:50 no controlo interno de extração B, pelo que as reações preparadas para a deteção molecular de *Xf*, de acordo com os métodos de Harper e Ouyang (EPPO, 2019), foram efetuadas com as amostras diluídas de 1:50 e com as amostras diluídas de 1:10.

Para a detecção das restantes setes amostras (80, 81, 82, 83, 84, 85, 86), prepararam-se duas reações, uma com o DNA total extraído e outra com a sua diluição de 1:50.

A detecção de *Xf* em pecíolos, folhas e ramos assintomáticos foi realizada por *Real-Time PCR* (RT-PCR) de acordo com os métodos de Harper e Ouyang (EPPO, 2019), tendo-se obtido resultados congruentes entre os dois testes moleculares. Das dezasseis amostras analisadas, nenhuma apresentava sintomas aparentes da doença causada por *Xf*, contudo a análise RT-PCR indicou que em cinco amostras foi detetada a presença da bactéria e em onze *Xf* não foi detetada.

O ensaio para detecção de *Xf* foi considerado positivo quando ambas as reações apresentaram uma curva de amplificação exponencial. Por outro lado, as amostras foram consideradas negativas quando não apresentaram uma curva de amplificação em ambos os métodos. Os resultados obtidos nas reações de RT-PCR para a detecção de *Xf* encontram-se na tabela 9.

Tabela 9. Resultados dos ensaios de detecção molecular de *Xf* por RT-PCR de acordo com os métodos de Harper e Ouyang.

	Amostra	Espécie	Ensaio RT-PCR	
			Harper	Ouyang
<b>07/02/2022</b>	42 F	<i>Adenocarpus</i> sp.	-	-
	42 R	<i>Adenocarpus</i> sp.	+	+
	43 F	<i>Lavandula dentata</i>	-	-
	43 R	<i>Lavandula dentata</i>	-	-
	44 F	<i>Lavandula dentata</i>	-	-
	44 R	<i>Lavandula dentata</i>	-	-
	45 F	<i>Dimorphoteca</i>	+	+
	45 R	<i>Dimorphoteca</i>	+	+
	46	<i>Gazania</i> sp.	+	+
	<b>14/02/2022</b>	80	<i>Quercus robur</i>	-
81		<i>Quercus robur</i>	-	-
82		<i>Quercus robur</i>	-	-
83		<i>Ulex</i> sp.	-	-
84		<i>Quercus suber</i>	-	-
85		<i>Cytisus scoparius</i>	+	+
86		<i>Quercus suber</i>	-	-

As espécies em que foi detetada *Xf* e os controlos positivos apresentaram uma curva de amplificação exponencial e um valor de Cq (*Quantification cycle*) entre 19,08 e 37,13. O sinal de fluorescência nas espécies em que *Xf* não foi detetada e nos controlos negativos permaneceu abaixo do limite *threshold*, apresentando um valor de Cq igual a zero (Figura 6).

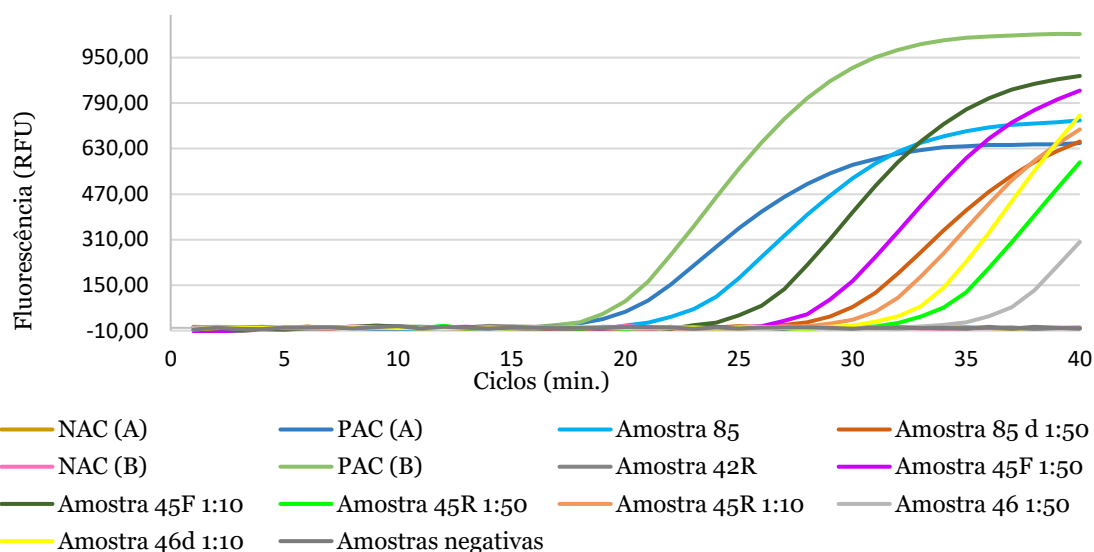


Figura 6. Curvas de amplificação de RT-PCR de acordo com o método de Harper (EPPO, 2019) para a detecção molecular de *Xf*.

NAC e PAC (A) – Controlo negativo e positivo, respetivamente, para as amostras 80 a 85;

NAC e PAC (B) – Controlo negativo e positivo, respetivamente, para as amostras 42 a 46.

Na amostra 42, o resultado da deteção nas folhas foi negativo e nos ramos positivo, embora o Cq tenha sido tardio, podendo estar associado a uma distribuição desigual da bactéria no hospedeiro como comumente referido na literatura (EPPO, 2019).

A deteção por PCR em tempo real de *Xf* em plantas assintomáticas pode indicar que esta pode colonizar hospedeiros sem induzir sintomas. Contudo, pressupõe-se que a população de *Xf* seja menor em plantas assintomáticas do que em plantas sintomáticas.

### 4.3 Análise MLST

Os resultados da amplificação dos sete genes *housekeeping* que constituem o esquema MLST para *Xf* (EPPO, 2019) encontram-se nas figuras 7 a 13, respetivamente.

Inicialmente fez-se uma amplificação dos sete genes *housekeeping* com a enzima *DNA Polymerase Platinum* (Invitrogen), posteriormente foram analisados os produtos de reação de PCR em gel de agarose para cada gene. Na análise do gel de agarose foi possível observar amplificação do fragmento com o tamanho esperado (~708 pb) do gene *leuA* em todas as amostras (Figura 7). Na amplificação do gene *petC* observou-se amplificação do fragmento com o tamanho esperado (~533 pb) em todas as amostras, contudo na amostra 1, o fragmento apresentou uma banda mais ténue, cuja foi novamente amplificada (Figura 8). O gene *malF* obteve amplificação no tamanho expectável (~730 pb) (Figura 9). Relativamente ao gene *cysG* embora tenha sido possível visualizar banda

no tamanho esperado (~600 pb), não foi possível visualizar banda em quatro amostras (Figura 10). A amplificação do gene *holC* apresentou banda no tamanho expectável (~379 pb) (Figura 11), tal como o gene *nuoL*, com tamanho esperado (~557 pb) (Figura 12). Por fim, foi possível observar amplificação do gene *gltT* com tamanho esperado (~654 pb) na maioria das amostras à exceção de uma (Figura 13).

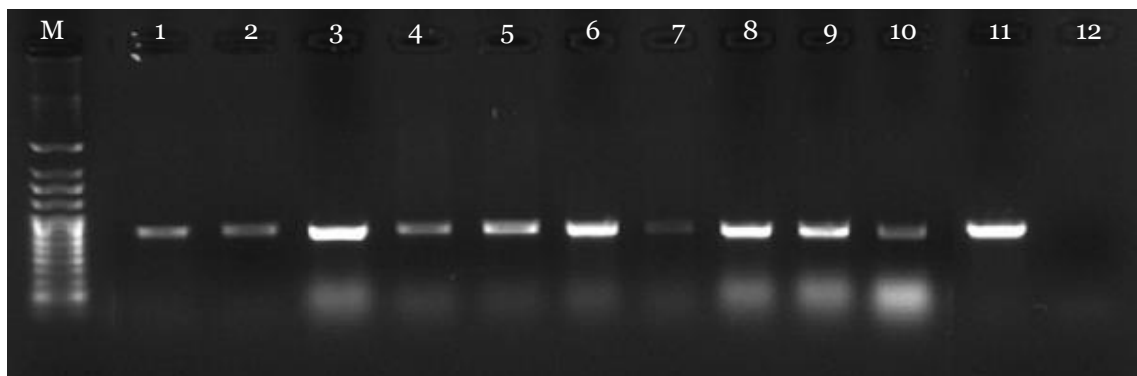


Figura 7. Análise dos produtos da reação de PCR em gel de agarose para o gene *leuA*.  
M – NZYDNA Ladder III, 1 - Amostra 45F, 2 – Amostra 46F, 3 – Amostra 85, 4 – Amostra 2307, 5 – Amostra 2308, 6 – Amostra 2591, 7 – Amostra 2520, 8 – Amostra 2531, 9 – Amostra 2612, 10 - Amostra 2640, 11 - Controlo positivo, 12 - Controlo negativo

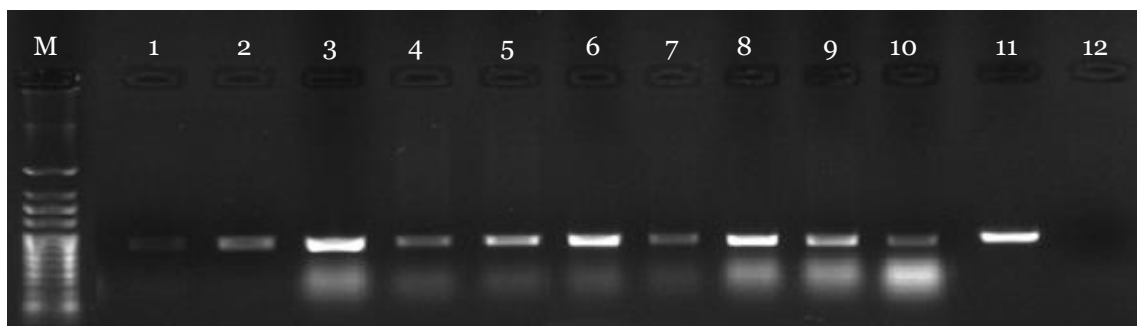


Figura 8. Análise dos produtos da reação de PCR em gel de agarose para o gene *petC*.  
M – NZYDNA Ladder III, 1 - Amostra 45F, 2 – Amostra 46F, 3 – Amostra 85, 4 – Amostra 2307, 5 – Amostra 2308, 6 – Amostra 2591, 7 – Amostra 2520, 8 – Amostra 2531, 9 – Amostra 2612, 10 - Amostra 2640, 11 - Controlo positivo, 12 - Controlo negativo

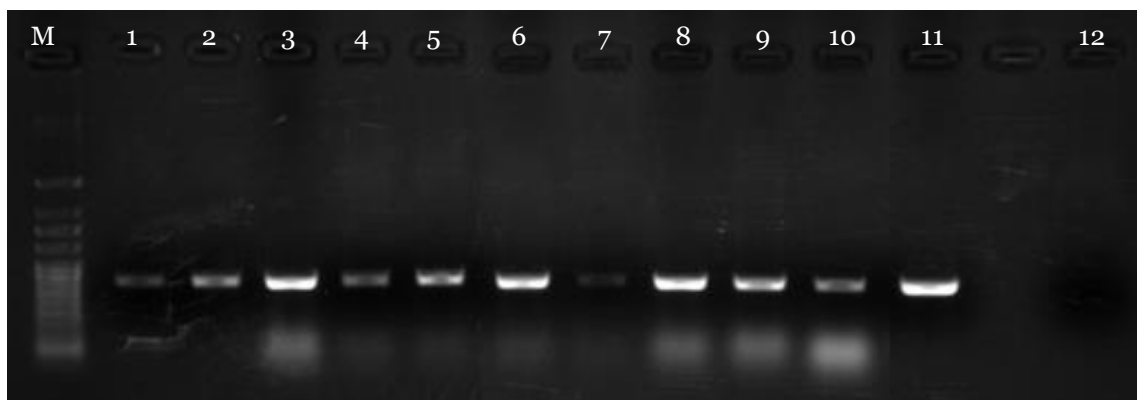


Figura 9. Análise dos produtos da reação de PCR em gel de agarose para o gene *malF*.  
M – NZYDNA Ladder III, 1 - Amostra 45F, 2 – Amostra 46F, 3 – Amostra 85, 4 – Amostra 2307, 5 – Amostra 2308, 6 – Amostra 2591, 7 – Amostra 2520, 8 – Amostra 2531, 9 – Amostra 2612, 10 - Amostra 2640, 11 - Controlo positivo, 12 - Controlo negativo

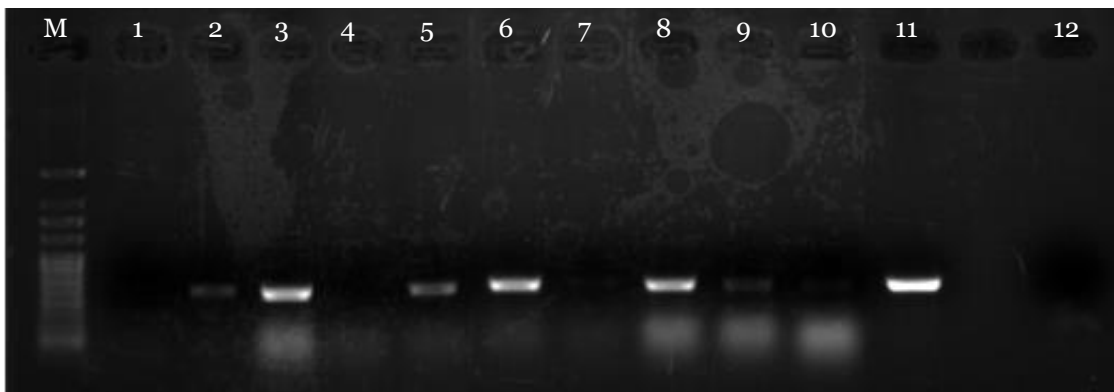


Figura 10. Análise dos produtos da reação de PCR em gel de agarose para o gene *cysG*.  
 M – NZYDNA Ladder III, 1 - Amostra 45F, 2 – Amostra 46F, 3 – Amostra 85, 4 – Amostra 2307, 5 – Amostra 2308, 6 – Amostra 2591, 7 – Amostra 2520, 8 – Amostra 2531, 9 – Amostra 2612, 10 - Amostra 2640, 11 - Controlo positivo, 12 - Controlo negativo

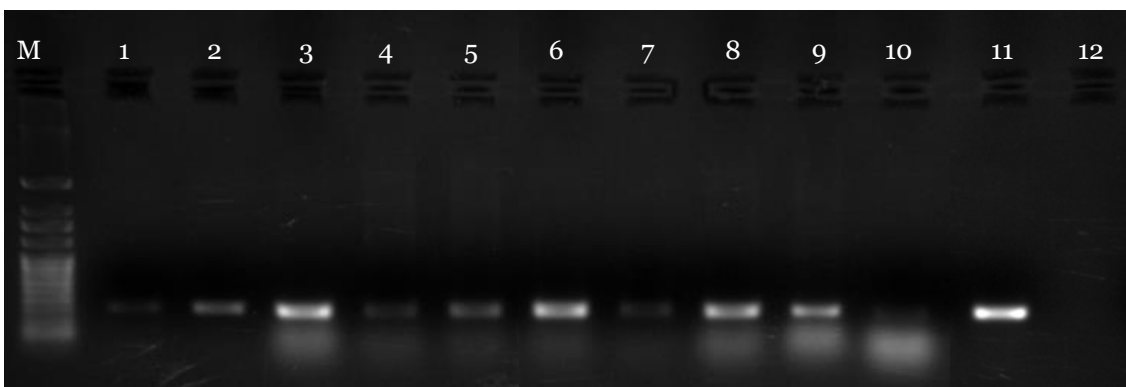


Figura 11. Análise dos produtos da reação de PCR em gel de agarose para o gene *holC*.  
 M – NZYDNA Ladder III, 1 - Amostra 45F, 2 – Amostra 46F, 3 – Amostra 85, 4 – Amostra 2307, 5 – Amostra 2308, 6 – Amostra 2591, 7 – Amostra 2520, 8 – Amostra 2531, 9 – Amostra 2612, 10 - Amostra 2640, 11 - Controlo positivo, 12 - Controlo negativo

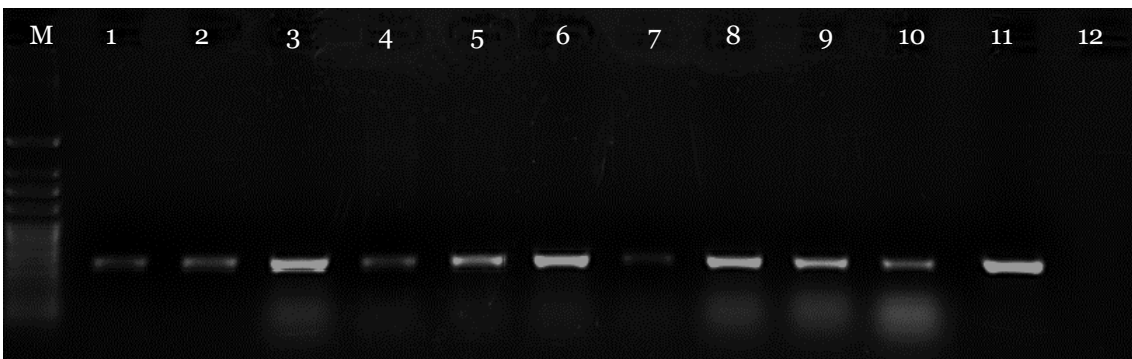


Figura 12. Análise dos produtos da reação de PCR em gel de agarose para o gene *nuoL*.  
 M – NZYDNA Ladder III, 1 - Amostra 45F, 2 – Amostra 46F, 3 – Amostra 85, 4 – Amostra 2307, 5 – Amostra 2308, 6 – Amostra 2591, 7 – Amostra 2520, 8 – Amostra 2531, 9 – Amostra 2612, 10 - Amostra 2640, 11 - Controlo positivo, 12 - Controlo negativo

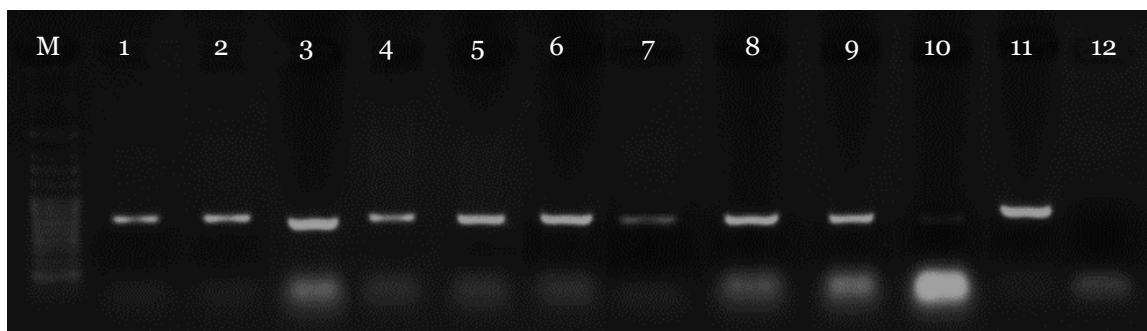


Figura 13. Análise dos produtos da reação de PCR em gel de agarose para o gene *gltT*.

M – NZYDNA Ladder III, 1 - Amostra 45F, 2 – Amostra 46F, 3 – Amostra 85, 4 – Amostra 2307, 5 – Amostra 2308, 6 – Amostra 2591, 7 – Amostra 2520, 8 – Amostra 2531, 9 – Amostra 2612, 10 - Amostra 2640, 11 - Controlo positivo, 12 - Controlo negativo

Através da análise dos produtos resultantes da reação PCR, é possível observar que foram obtidos resultados de amplificação positivos. A banda presente, para cada um dos genes, corresponde ao peso molecular expectável, já a ausência de banda no controlo negativo indica que não ocorreram contaminações nem reações inespecíficas. Nas amostras onde não se observou uma banda ou esta foi pouco intensa, fez-se uma re-amplificação e nas restantes amostras, devido à presença de dímeros de *primers*, a banda que continha o fragmento de DNA foi excida e purificada.

Procedeu-se à sequenciação por ONT, utilizando o *Native Barcoding Sequencing kit*, durante aproximadamente 14 horas. Porém, não foi possível obter as sequências dos genes. As sequências obtidas apresentavam muitos erros, encontravam-se fragmentadas, e sem correspondência para os genes amplificados. Para verificar o problema da sequenciação procedeu-se à sequenciação dos genes MLST pelo método *standard Sanger*.

O método utilizado para identificação da subespécie e para a determinação do ST baseia-se na sequenciação parcial de sete genes *housekeeping* (*leuA*, *petC*, *malF*, *cysG*, *holC*, *nuoL* e *gltT*). Contudo é possível identificar a subespécie apenas através da amplificação e sequenciação parcial de dois genes *cysG* e *malF* (Faino *et al.*, 2021). Desta forma, foi novamente realizada a amplificação e purificação destes dois genes para as doze amostras. Os produtos de amplificação purificados de cada um dos dois genes, foram sequenciados pelo método de Sanger, como serviço contratado. As amostras foram enviadas com 10 µL de cada produto de amplificação e 3 µL do *primer reverse* usado para a sua amplificação, a uma concentração de 10 µM.

Os resultados da sequenciação pelo método de Sanger também não foram os esperados. As amostras foram analisadas no *software BioEdit*, onde foi possível visualizar as sequências e o respetivo cromatograma. Pela análise realizada, apenas foi possível obter resultados positivos em duas amostras. As restantes apresentaram sequências muito

curtas ou contaminadas e com várias interferências. Adicionalmente, foram realizadas análises adicionais por BLAST, que permitiram identificar a subespécie. A subespécie identificada em ambas as amostras foi a subespécie *multiplex*. No entanto, há que ter em conta que normalmente para este tipo de análise MLST são usadas estirpes isoladas em que apenas há DNA da bactéria. Neste caso, utilizou-se DNA total e não o DNA extraído da bactéria. Posto isto a probabilidade de ter produtos de amplificação contaminados e amplificações inespecíficas é maior, e foi o que se verificou. Contudo, os *primers* usados podem também não ser suficientemente específicos para a mistura dos genes.

#### 4.4 Amplificação do gene 16S rRNA

Para determinar a diversidade estrutural das comunidades bacterianas endófitas de vários hospedeiros, o gene 16S rRNA foi amplificado por PCR conforme descrito nos Materiais e Métodos (secção 3.6).

Inicialmente fez-se uma amplificação do gene 16S rRNA com a enzima *NzyProof DNA polymerase* (NZYTech), contudo na análise do gel de agarose não foi possível observar qualquer banda. Posto isto, fez-se uma nova amplificação para uma amostra usando outras duas enzimas, a *NZYTaq II 2x Green Master Mix* (NZYTech) e a *Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs). Através da análise dos produtos resultantes da reação PCR (Figura 14), foi possível observar amplificação de um fragmento, com ambas as enzimas testadas, sendo que as bandas visualizadas com a enzima *NZYTaq II 2x Green Master Mix* foram mais intensas. Todavia, para ambas as enzimas, a presença de banda encontrou-se no tamanho esperado ( $\approx 1500$  pb).

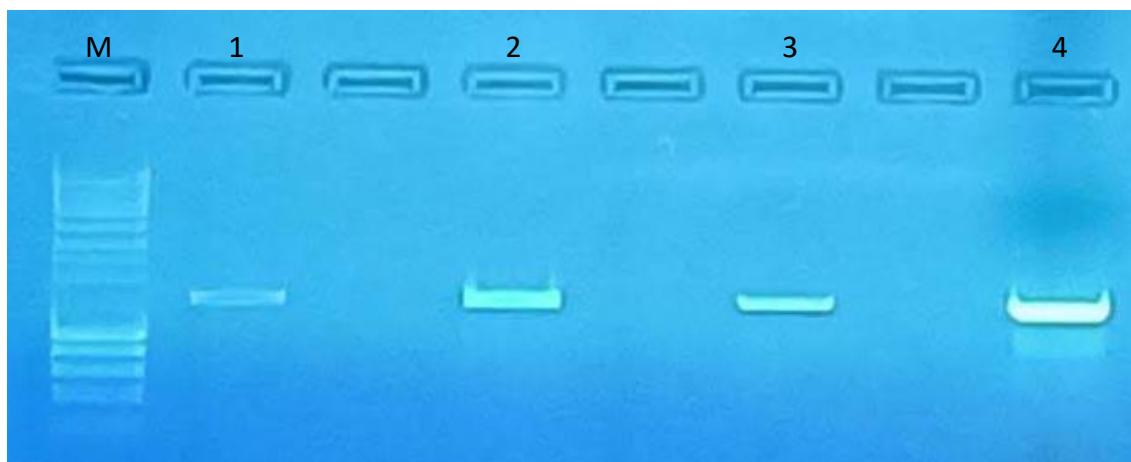


Figura 14. Amplificação do gene 16S rRNA com a enzima *Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase* e a *NZYTaq II 2x Green Master Mix* para a amostra 46F.

M - NZYDNA Ladder III, 1 – Reação com a enzima *Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase* com 5  $\mu$ L carregados no poço, 2 – Reação com a enzima *Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase* com 45  $\mu$ L carregados no poço, 3 – Reação com a enzima *NZYTaq II 2x Green Master Mix* com 5  $\mu$ L carregados no poço, 4 - Reação com a enzima *NZYTaq II 2x Green Master Mix* com 45  $\mu$ L carregados no poço

Consequentemente, após várias experiências, o ensaio para amplificação do gene 16S rRNA prosseguiu para todas as amostras com a enzima *NZYTaq II 2x Green Master Mix*. Foram realizadas dezassete reações e paralelamente foram preparados dois controlos, um com mPNA e pPNA, e outro sem a adição de PNA's (Figura 15).

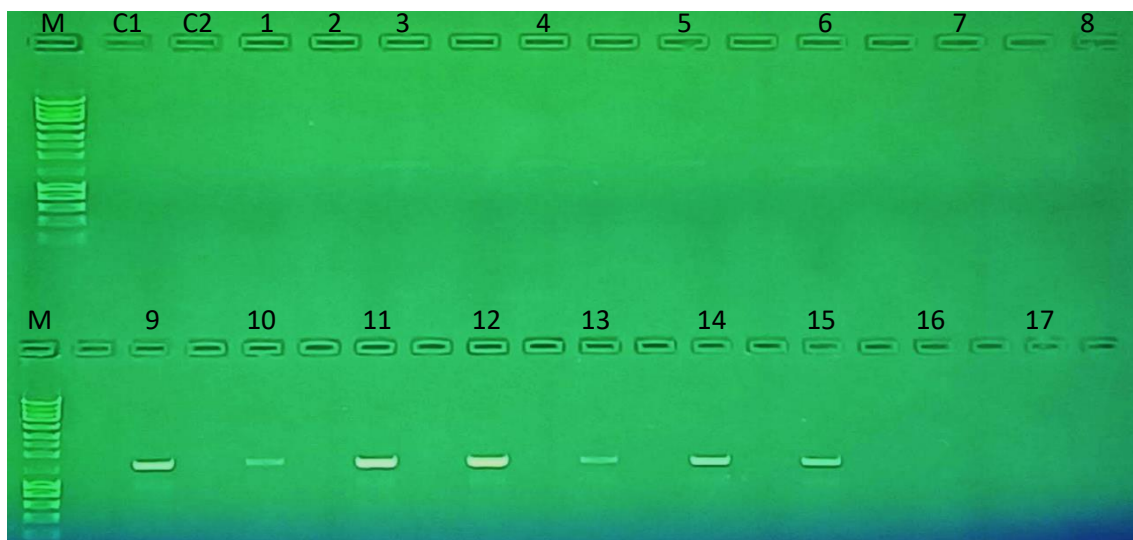


Figura 15. Amplificação do gene 16S rRNA com a enzima *NZYTaq II 2x Green Master Mix*. M – NZYDNA Ladder III, C1 – Controlo com PNA's, C2 – Controlo sem PNA's, 1 – Amostra 42F, 2 – Amostra 42R, 3 – Amostra 43F, 4 – Amostra 43R, 5 – Amostra 44F, 6 – Amostra 44R, 7 – Amostra 45F, 8 – Amostra 45R, 9 – Amostra 46F, 10 – Amostra 85, 11 – Amostra 193F, 12 – Amostra 193R, 13 – Amostra 197, 14 – Amostra 198F, 15 – Amostra 198R, 16 – Amostra 199F, 17 – Amostra 199R

Das dezassete amostras, sete obtiveram uma banda visível e quatro uma banda muito ténue, pelo que, foi realizada uma nova amplificação com as amostras em que não foi possível visualizar qualquer banda. Deste modo, foram realizadas seis reações com o DNA diluído de 1:10 com a enzima *NZYTaq II 2x Green Master Mix*. Porém, na análise do gel de agarose apenas foi possível visualizar banda em duas reações (amostra 45F e 45R).

Após várias tentativas efetuadas que não resultaram numa amplificação, dado que se tinham observado anteriormente resultados positivos com a enzima *Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase*, voltou a usar-se essa enzima em seis reações que não tinham tido banda com a enzima *NZYTaq II 2x Green Master Mix*. Posteriormente, os produtos de PCR foram analisados e apenas se confirmou a amplificação do DNA nas amostras 42R e 199R.

Após verificar a concentração das amostras no *Qubit* e, uma vez que algumas bandas observadas na figura 15 eram muito ténues, decidiu-se amplificar novamente todas as amostras para garantir que havia DNA suficiente para iniciar o protocolo de

sequenciação. Deste modo, prepararam-se dezoito reações com 2 µL do DNA amplificado anteriormente (Figura 16).

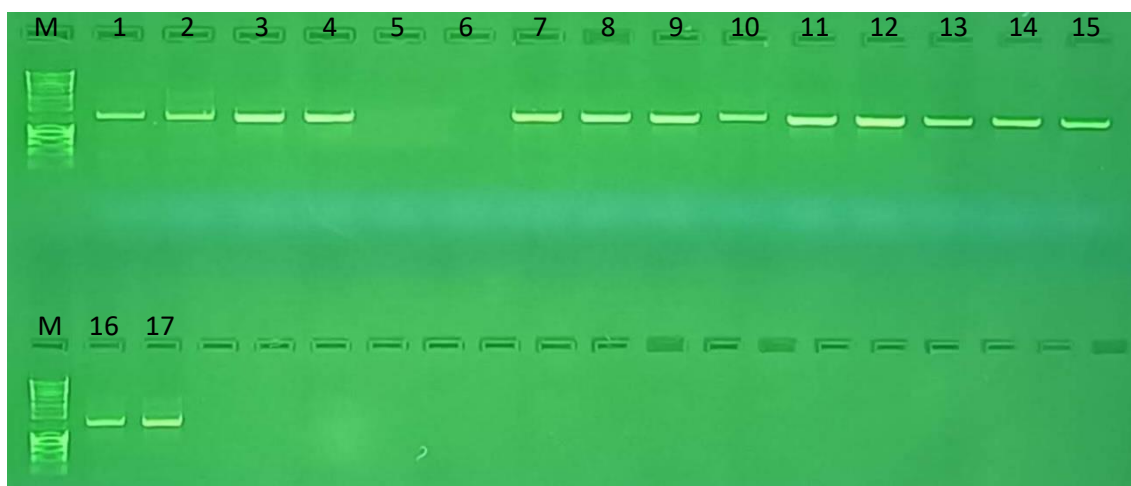


Figura 16. Re-amplificação do gene 16S rRNA com 2 µL do DNA amplificado.

M – NZYDNA Ladder III, 1 – Amostra 42F, 2 – Amostra 42R, 3 – Amostra 43F, 4 – Amostra 43R, 5 – Amostra 44F, 6 – Amostra 44R, 7 – Amostra 45F, 8 – Amostra 45R, 9 – Amostra 46F, 10 – Amostra 85, 11 – Amostra 193F, 12 – Amostra 193R, 13 – Amostra 197, 14 – Amostra 198F, 15 – Amostra 198R, 16 – Amostra 199F, 17 – Amostra 199R

Das dezassete amostras amplificadas novamente, apenas duas não obtiveram amplificação, contudo só era possível usar doze amostras para iniciar o protocolo de sequenciação, devido ao *kit* EXP-NBD104, que apenas fornece doze *barcodes*. As amostras de DNA usadas foram as que apresentavam maior concentração no *Qubit* e encontram-se na tabela 10.

Tabela 10. Amostras usadas para o ensaio de sequenciação e o respetivo resultado do RT-PCR.

Amostra	Resultado RT-PCR
42R	+
43F	-
45F	+
45R	+
46F	+
85	+
193F	-
193R	-
197	-
198F	-
198R	-
199R	-

As amostras amplificadas escolhidas para iniciar o ensaio de sequenciação foram misturadas com as amostras amplificadas anteriormente. A mistura das duas reações foi levada ao *Concentrator Plus* para concentrar a amostra e diminuir o volume até aproximadamente 48  $\mu$ L.

#### 4.5 Sequenciação do gene 16S rRNA por nanoporos

Posteriormente, procedeu-se ao ensaio de sequenciação. Cada amostra foi identificada com um *barcode* e sequenciadas num dispositivo MinION *Mk1C*. A sequenciação através do dispositivo *MinION* permite que o utilizador defina um tempo de duração da sequenciação. A célula de fluxo gerou aproximadamente 5 Gb de dados durante aproximadamente 16 horas (Figura 17). A sequenciação foi interrompida antes de atingir o tempo máximo de execução de 24 horas. Após a sequenciação, as comunidades bacterianas foram analisadas usando a plataforma EPI2ME.

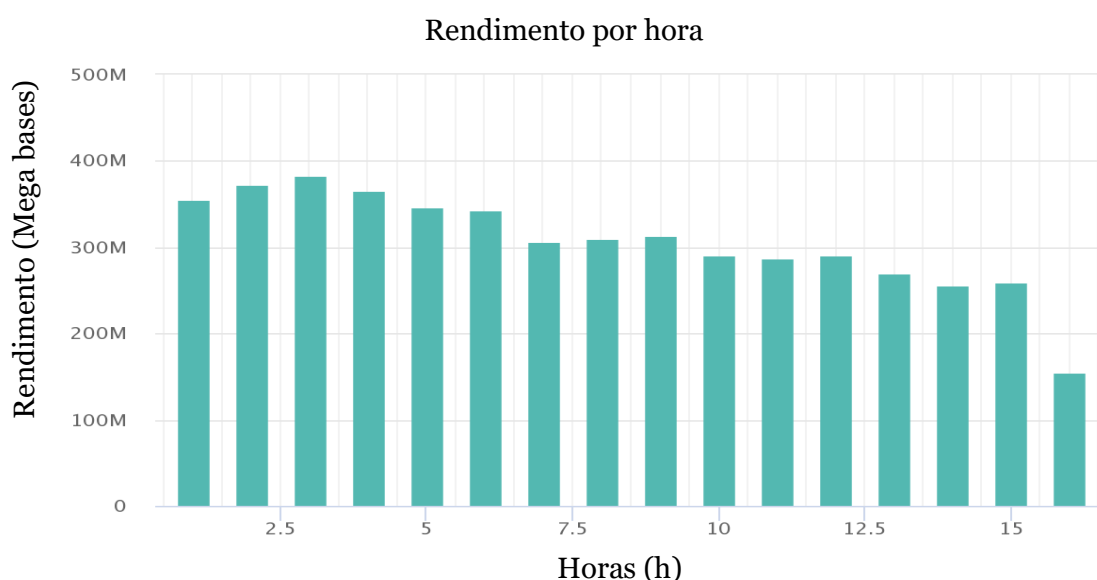


Figura 17. Rendimento (Mega bases) por hora (h) das sequências analisadas.

Após a filtragem das leituras foram analisadas aproximadamente 2 904 leituras. O score variou entre 8 e 15, sendo que as leituras com score inferior a 9 foram eliminadas, dada a sua baixa qualidade. Quanto maior o score, menor é a probabilidade de erro (Figura 18).

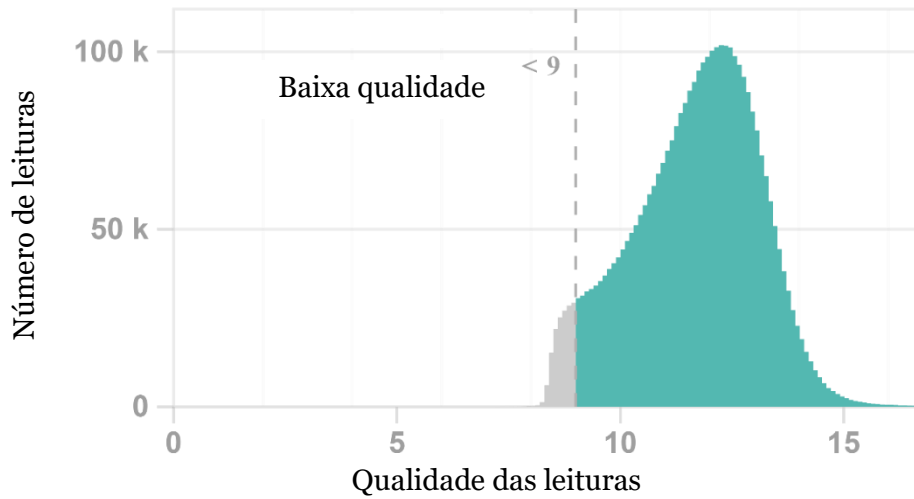


Figura 18. Qualidade das leituras (*qscore*) das amostras sequenciadas.

A maioria das leituras obtidas apresentava um tamanho médio de 1400 pb (Figura 19). Estas foram filtradas por tamanho, tal como descrito nos Materiais e Métodos e foram selecionadas as leituras que apresentavam o gene completo de 16S rRNA com as regiões variáveis V1 a V9.

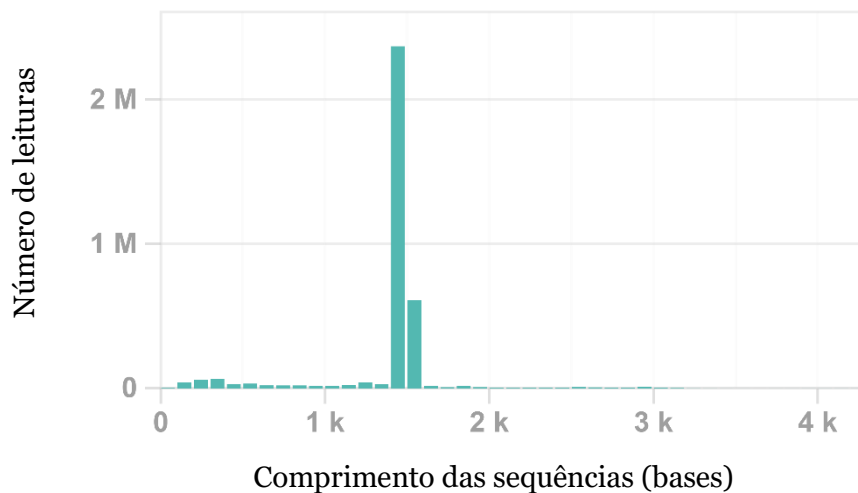


Figura 19. Comprimento das sequências analisadas.

Foram identificados 7 filos, 14 classes, 37 ordens, 76 famílias e 214 gêneros.

De forma geral, as amostras apresentaram o mesmo filo dominante, *Proteobacteria*. Apesar da identificação de 7 filos nas amostras analisadas, alguns representam menos de 0,1% da abundância total. As espécies dominantes das amostras foram *Xylella fastidiosa*, *Caballeronia sordidicola*, *Liberibacter crescens* e *Caballeronia terrestris*.

Na figura 20 encontra-se representada a árvore filogenética ao nível da espécie relativa a todas as amostras. Uma das espécies comuns a todas as amostras foi *Ralstonia pickettii*, tal como *Caballeronia sordidicola*, que só não se detetou na amostra 85.

*Ralstonia pickettii* tem a capacidade de sobreviver em ambientes com poucos nutrientes (água e solo) e usa uma variedade de compostos como fontes de energia e carbono. Tem demonstrado aptidão para degradar várias substâncias tóxicas, o que a torna uma excelente candidata para biorremediação (Ryan *et al.*, 2007). *Caballeronia sordidicola* é uma bactéria Gram-negativa do filo *Proteobacteria*, dominante na amostra 42R, apresentando o maior número de leituras. Esta bactéria realiza a fixação biológica de nitrogénio e promove o crescimento das plantas (Puri *et al.*, 2020).

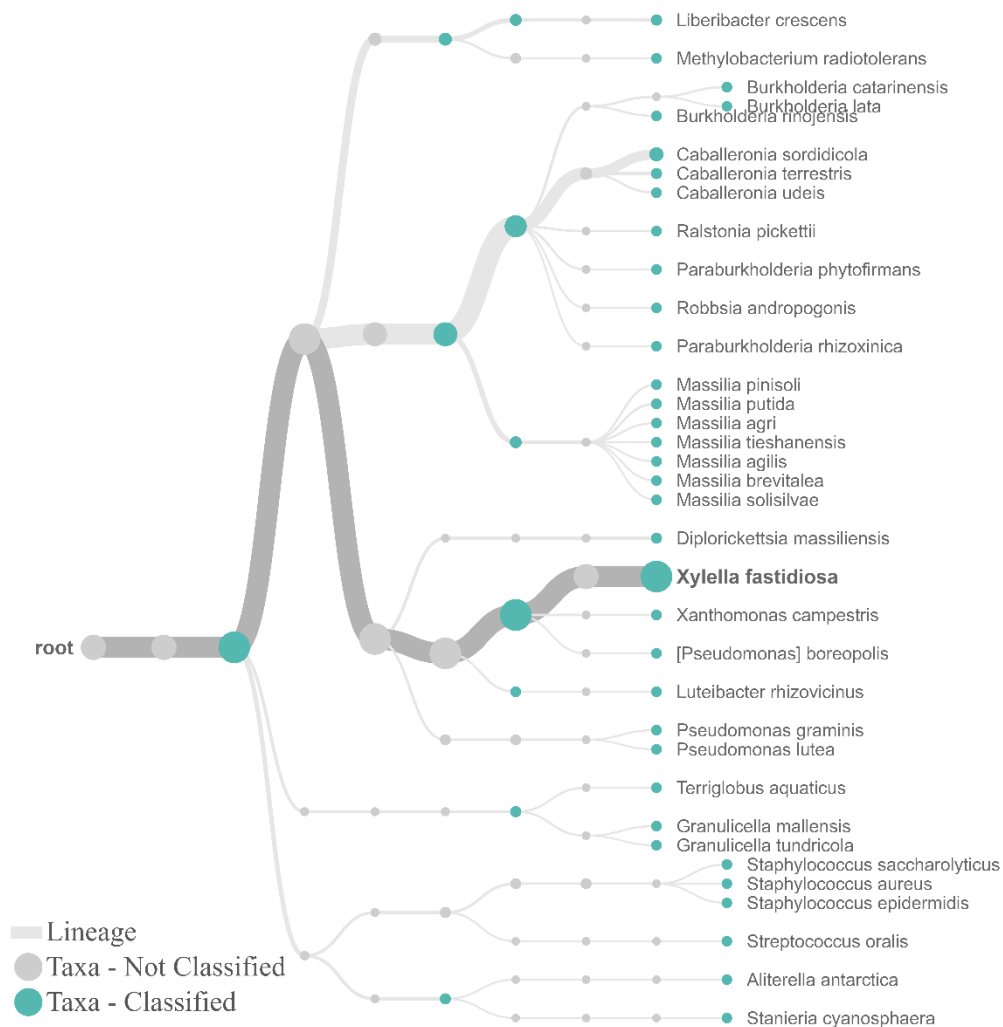


Figura 20. Árvore filogenética ao nível da espécie relativa a todas as amostras com um *cutoff* de abundância relativa de 0,1%.

Numa análise inicial dos resultados de sequenciação através do *software* EPI2ME foi identificada *Xylella* em todas as amostras, sendo que na deteção por PCR em tempo real, *Xf* não foi detetada em todas. Esta divergência de resultados entre técnicas pode estar relacionada com limites de deteção, mas não é possível retirar conclusões uma vez que a sensibilidade e especificidade não foram objeto de estudo.

A amostra 42R obteve 104,302 leituras, sendo as espécies dominantes *C. sordidicola*, *Massilia putida* e *Burkholderia catarinensis* (Figura 21). *X. fastidiosa* está presente, mas não é uma das espécies dominantes nesta amostra. *M. putida* é também uma das bactérias com mais leituras e tem a capacidade de produzir dimetil dissulfeto (DMDS), sendo que os produtores de DMDS têm o potencial de serem usados para controlar doenças foliares de plantas e promover o seu crescimento (Feng *et al.*, 2016). *B. catarinensis* é uma das bactérias mais abundantes nesta amostra e tem a capacidade de

produzir fitohormonas e sideróforos, sendo também capaz de controlar o crescimento de uma ampla gama de fungos patogênicos (Bach *et al.*, 2022; Bach *et al.*, 2017).

Na amostra 43F não era esperado identificar *X. fastidiosa*, uma vez que na detecção por PCR em tempo real esta bactéria não foi detectada. Esta amostra obteve o maior número de leituras (374,926) relativamente às restantes amostras pelo que, a análise voltará a ser repetida no futuro para confirmação deste resultado. Esta amostra apresentou como espécies dominantes *R. picketti*, *Bacillus mycoides* e *Delftia lacustris* (Figura 22). *B. mycoides* é um potencial agente de biocontrolo em várias plantas e tem uma atividade benéfica na promoção do crescimento vegetal (Yi *et al.*, 2017). *D. lacustris* foi sugerida como agente de biocontrolo para proteger plantas contra fitopatógenos. As plantas que contêm esta bactéria são menos suscetíveis à podridão radicular e à murchidão (Janahiraman *et al.*, 2016).

Na amostra 45F, *X. fastidiosa* foi a espécie dominante com 24,759 leituras. Apesar do hospedeiro não apresentar sintomas aparentes da doença causada por *Xf*, esta amostra continha uma grande abundância desta bactéria nas folhas. Além de *Xf* que se destacou no número de leituras, seguiu-se a *R. pickettii* e *Xanthomonas campestris* como espécies mais abundantes (Figura 23). *X. campestris* é um fitopatógeno responsável por perdas significativas em espécies agrícolas em todo o mundo. Esta bactéria é uma das principais causas de podridão em plantas, uma doença que resulta na degeneração dos tecidos (Liu *et al.*, 2015).

Na amostra 45R, *X. fastidiosa* foi a espécie com mais leituras, seguida de *R. pickettii* (Figura 24). Relativamente à amostra 46F, conforme esperado, *X. fastidiosa* foi identificada por sequenciação sendo uma das espécies com mais leituras, seguido de *Stanieria cyanosphaera*, *Aliterella antarctica* e *Loriellopsis cavernicola* (Figura 25). No entanto, estas três espécies pertencem ao filo das cianobactérias.

As cianobactérias são um grande grupo de procariotas fotoautotróficos encontrados em quase todos os ambientes e em grande abundância, particularmente nos oceanos (Adams *et al.*, 2013). Contudo, segundo vários estudos, o solo é o habitat de algumas espécies de cianobactérias terrestres que são organismos benéficos para a fixação biológica de nitrogénio e libertação de minerais para melhorar a fertilidade do solo e a produtividade das culturas (Shariatmadari *et al.*, 2013; Singh, 2014). As cianobactérias produzem vários metabolitos secundários que promovem o crescimento das plantas, aumentam a resistência a doenças e ajudam a combater o stress biótico e abiótico (Kollmen & Strieth, 2022; Singh, 2014). Estas formam relações simbióticas com uma ampla gama de hospedeiros, nomeadamente plantas e fungos (Adams *et al.*, 2013). Aquando da simbiose

das cianobactérias com a planta, as cianobactérias fixam-se à planta, podendo entrar através dos estomas e colonizar o espaço intercelular (Kollmen & Strieth, 2022; Singh, 2014).

Na amostra 85, uma das espécies dominantes foi *X. fastidiosa* com o segundo maior número de leituras relativamente às restantes amostras. As seguintes espécies com mais leituras foram *Liberibacter crescens*, *Diplorickettsia massiliensis* e *X. campestris* (Figura 26). *Liberibacter crescens* é uma espécie cultivável do género *Liberibacter* e encontra-se próximo da espécie *Candidatus liberibacter*. Estas espécies bacterianas limitadas ao floema estão associadas a doenças nas plantas (Naranjo *et al.*, 2020). *D. massiliensis* é uma bactéria intracelular obrigatória, foi isolada do carrapato e é patogénica tanto para humanos quanto para animais (Subramanian *et al.*, 2012). *X. campestris* como referido anteriormente é um fitopatógeno responsável pela degeneração dos tecidos (Liu *et al.*, 2015). A ocorrência desta espécie pode indicar que a infeção por *Xf* origina uma maior suscetibilidade à infeção por outros patógenos.

A amostra 193F tem como espécie dominante *A. antarctica*, seguido de *X. fastidiosa*, *S. cyanosphaera* e *C. sordidicola* (Figura 27). Não era esperado identificar *X. fastidiosa* nesta amostra, uma vez que na deteção por PCR em tempo real esta bactéria não foi detetada. O mesmo aconteceu com a amostra 193R, que embora não fosse esperado identificar *Xf*, esta apresentou um maior número de leituras, juntamente com *A. antarctica* e *S. Cyanosphaera* (Figura 28).

Na amostra 197, as espécies dominantes foram *A. antarctica*, *S. cyanosphaera* e *R. pickettii* (Figura 29). Como mencionado anteriormente, a *A. antarctica* e a *S. cyanosphaera* pertencem ao filo das cianobactérias e também são organismos importantes na promoção do crescimento das plantas e na resistência a doenças (Kollmen & Strieth, 2022; Singh, 2014).

Na amostra 198F, a espécie dominante foi *S. cyanosphaera*, *A. antartica* e *X. fastidiosa* (Figura 30) e na amostra 198R, a espécie dominante foi *X. fastidiosa*, apresentando o maior número de leituras relativamente às restantes amostras negativas, seguido de *C. sordidicola* (Figura 31).

Por fim, a amostra 199R apresenta como espécies dominantes *C. sordidicola*, *C. terrestris* e *C. udeis* (Figura 32). De todas as amostras, esta é a que apresenta menor quantidade de leituras de *Xf*. *C. udeis* é uma bactéria responsável pela fixação biológica de nitrogénio e crescimento de plantas (Madhaiyan *et al.*, 2021; Vandamme *et al.*, 2013).

Na figura 21 a 32, respectivamente, encontram-se as árvores filogenéticas ao nível da espécie. Para cada árvore foi aplicado um *cutoff* de abundância relativa de 0,1% para excluir os taxa com poucas leituras.

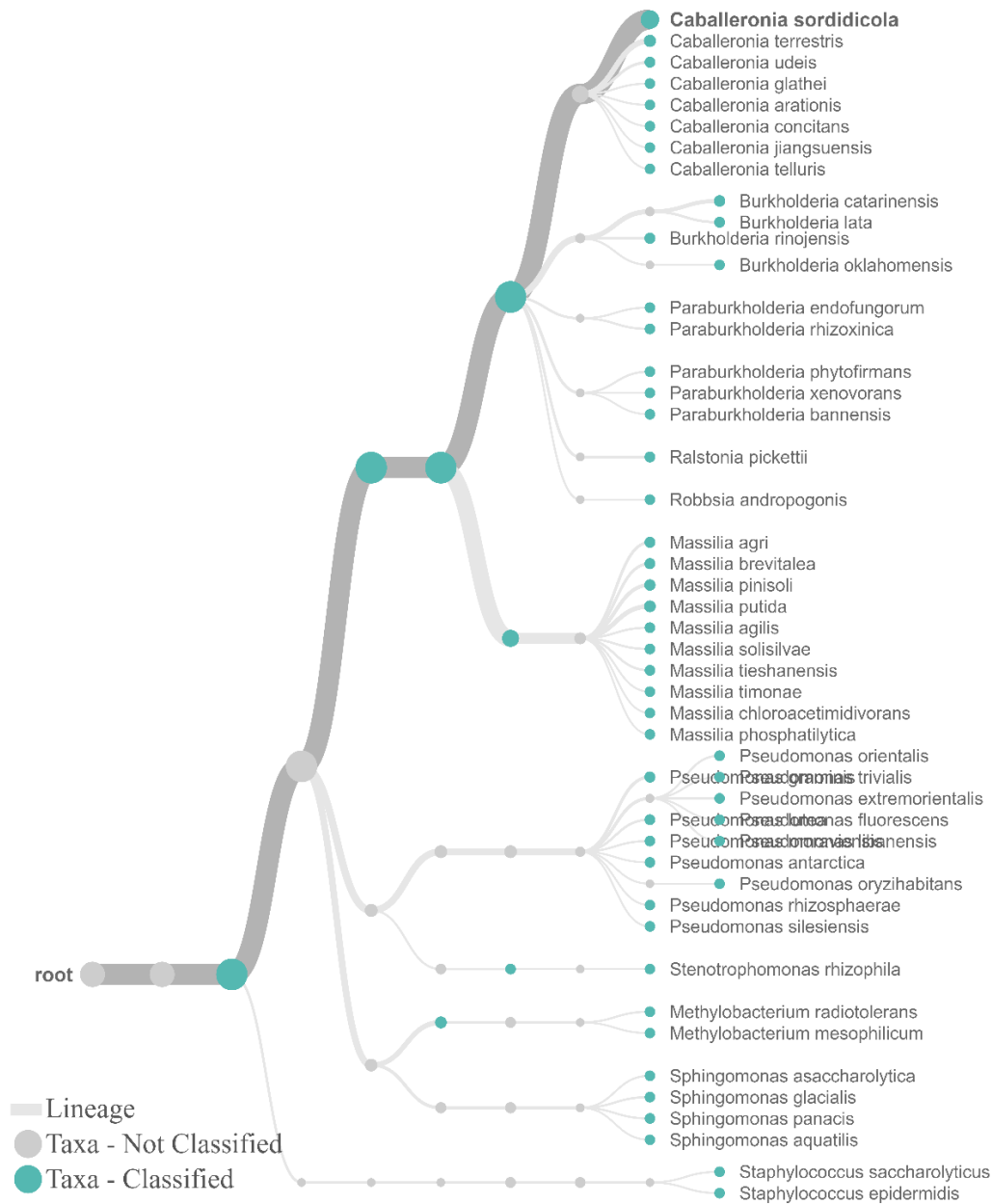


Figura 21. Árvore filogenética ao nível da espécie da amostra 42R, baseada na análise completa do gene 16S rRNA obtido através da plataforma *MinION* e analisado com o *software* EPI2ME.

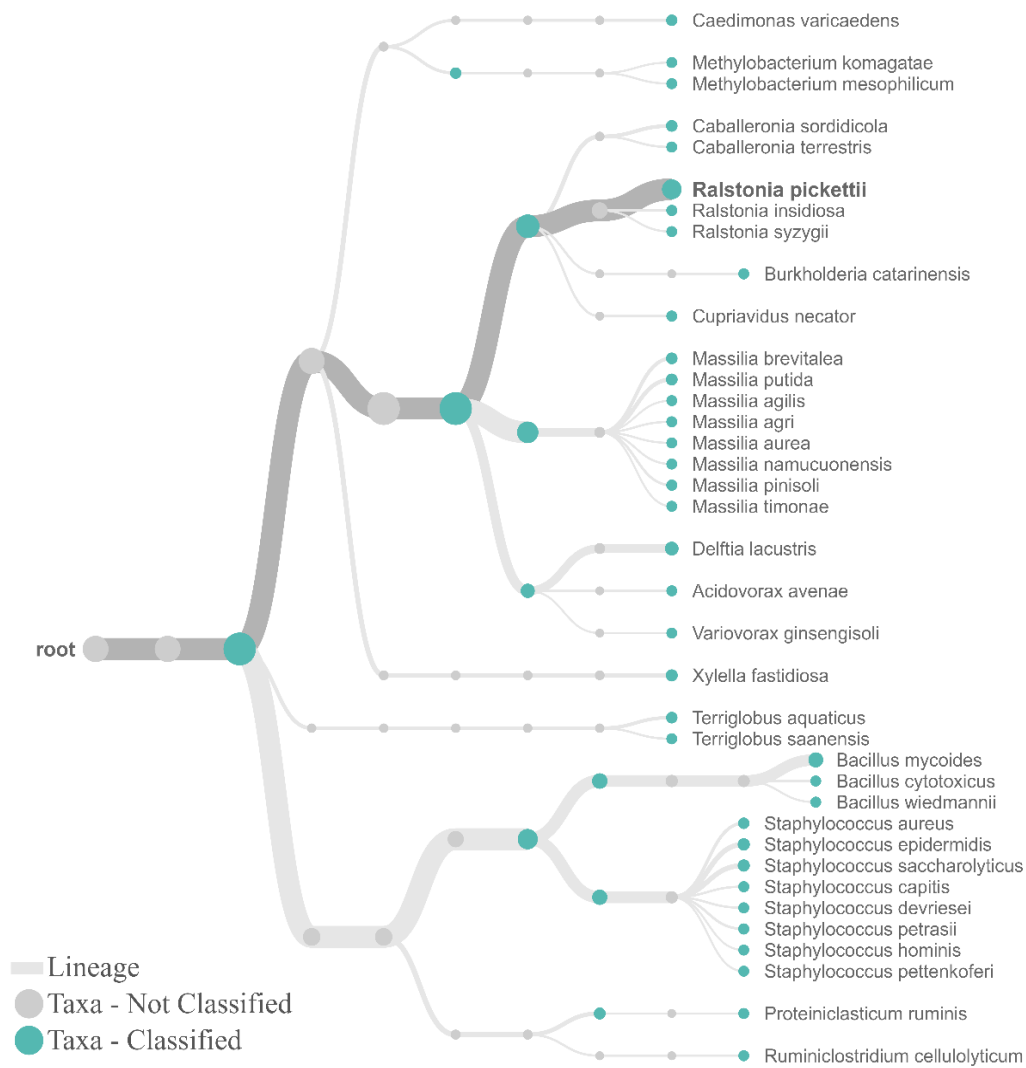


Figura 22. Árvore filogenética ao nível da espécie da amostra 43F, baseada na análise completa do gene 16S rRNA obtido através da plataforma *MinION* e analisado com o *software* EPI2ME.

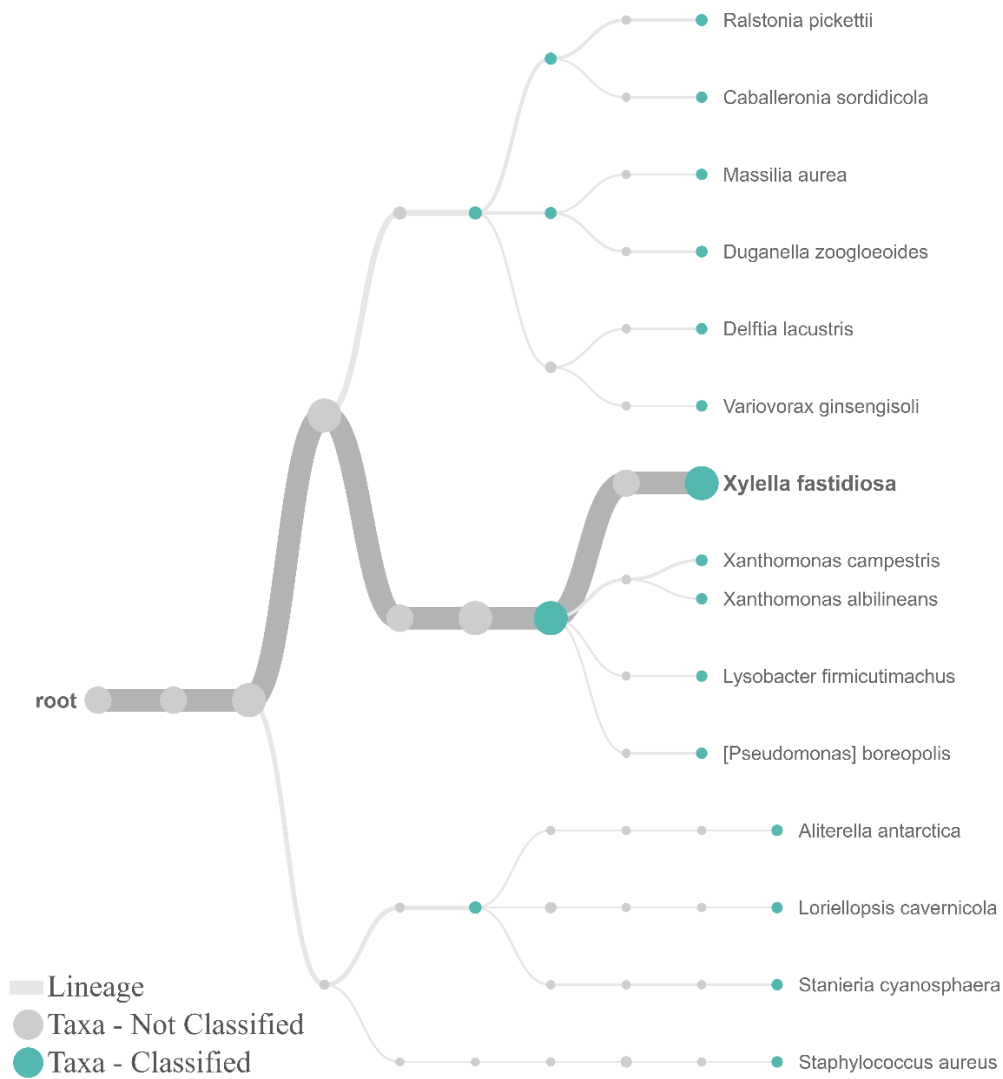


Figura 23. Árvore filogenética ao nível da espécie da amostra 45F, baseada na análise completa do gene 16S rRNA obtido através da plataforma *MinION* e analisado com o *software* EPI2ME.

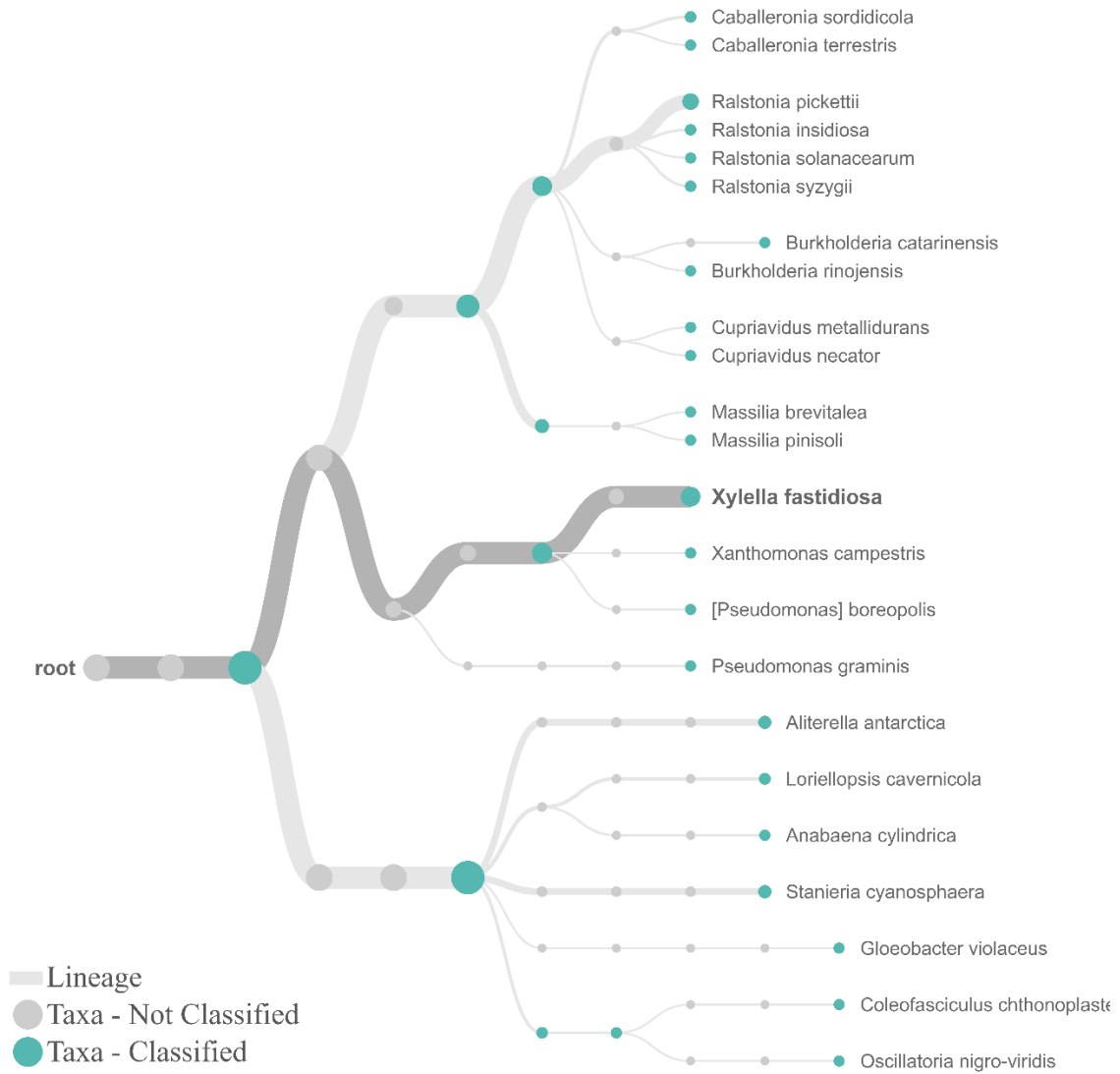


Figura 24. Árvore filogenética ao nível da espécie da amostra 45R, baseada na análise completa do gene 16S rRNA obtido através da plataforma *MinION* e analisado com o *software* EPI2ME.



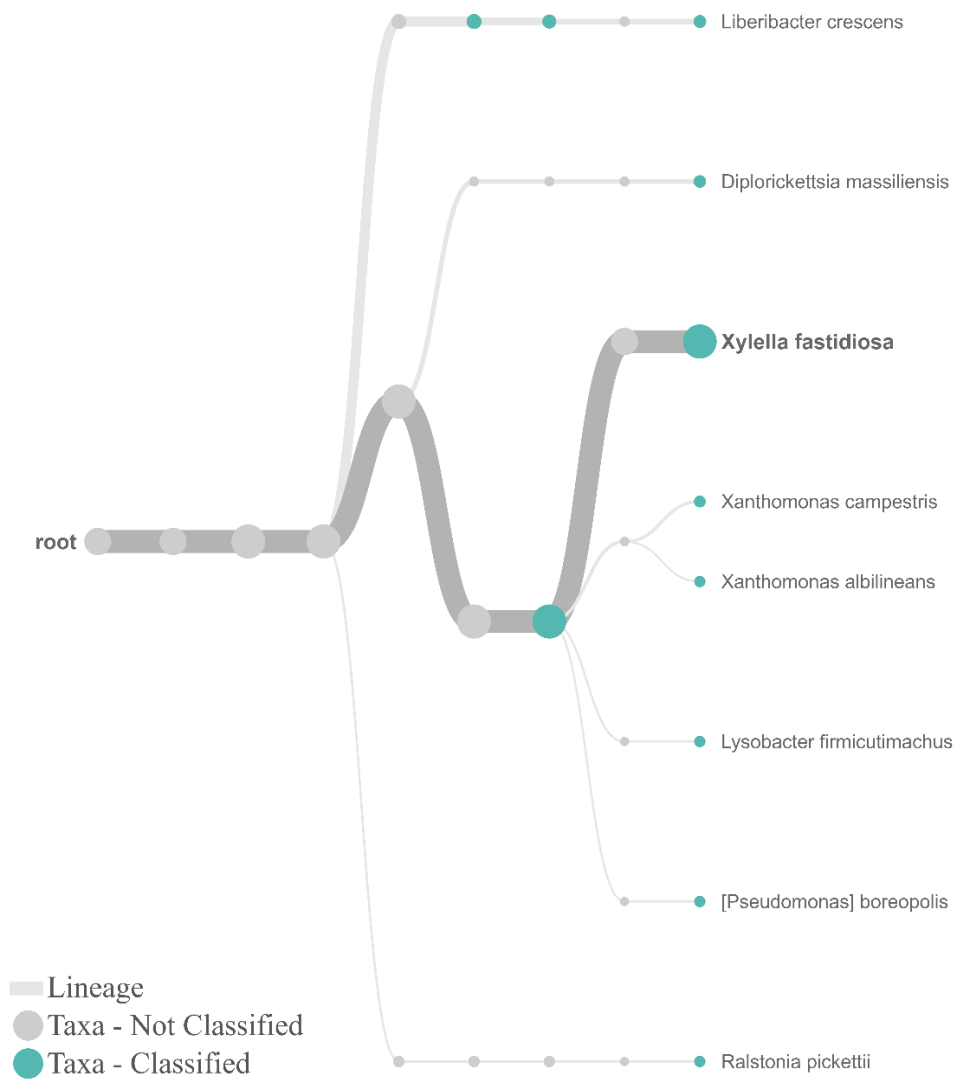


Figura 26. Árvore filogenética ao nível da espécie da amostra 85, baseada na análise completa do gene 16S rRNA obtido através da plataforma *MinION* e analisado com o *software* EPI2ME.

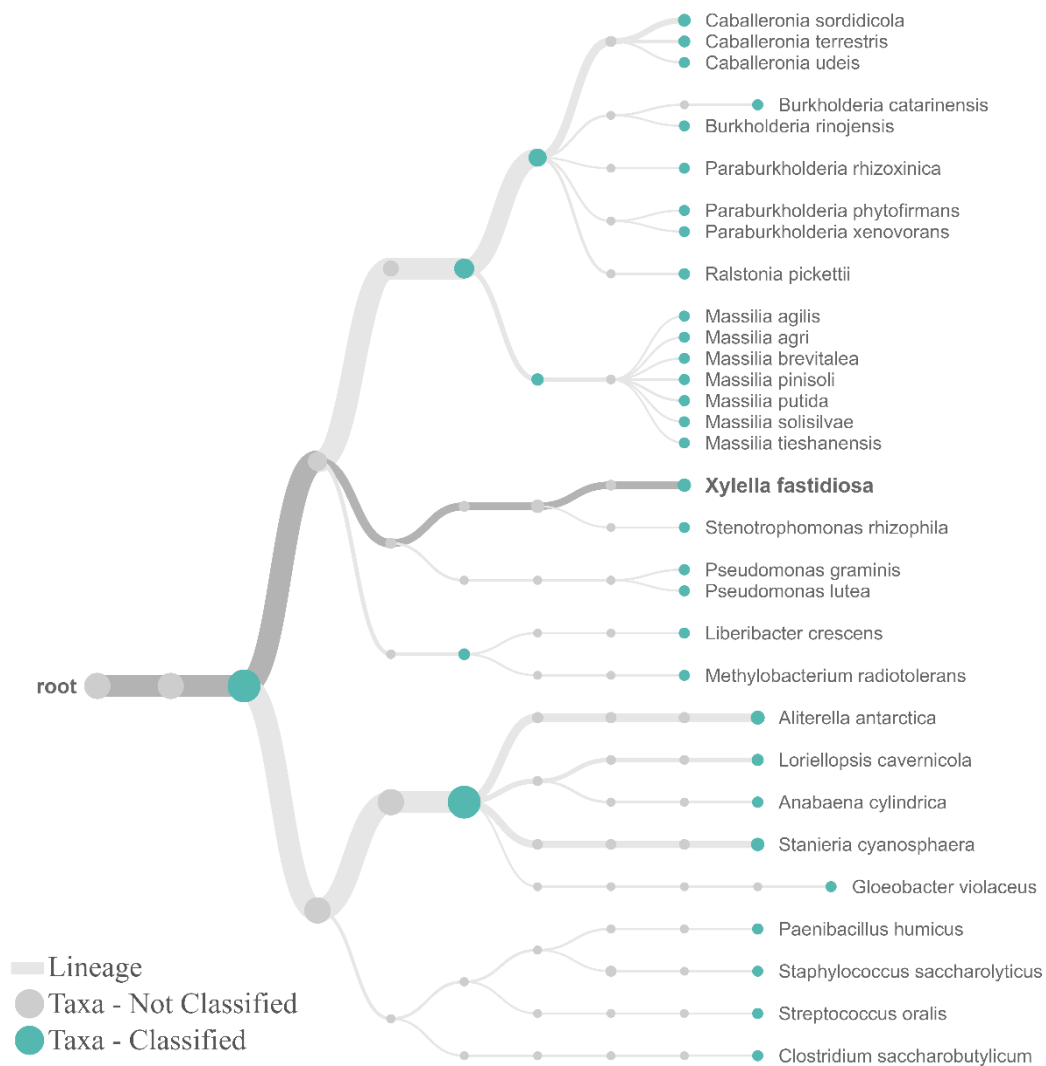


Figura 27. Árvore filogenética ao nível da espécie da amostra 193F, baseada na análise completa do gene 16S rRNA obtido através da plataforma *MinION* e analisado com o *software* EPI2ME.

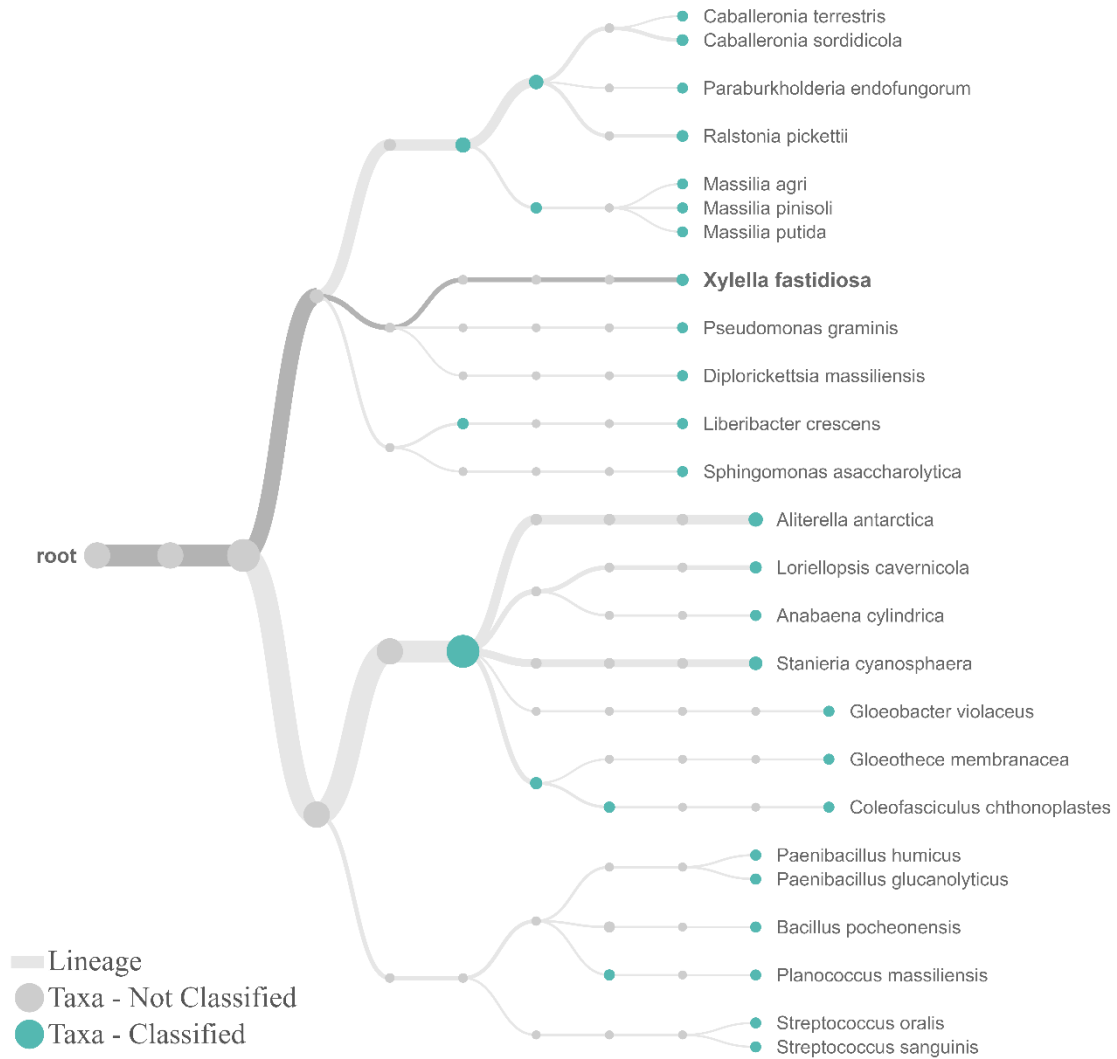


Figura 28. Árvore filogenética ao nível da espécie da amostra 193R, baseada na análise completa do gene 16S rRNA obtido através da plataforma *MinION* e analisado com o *software* EPI2ME.

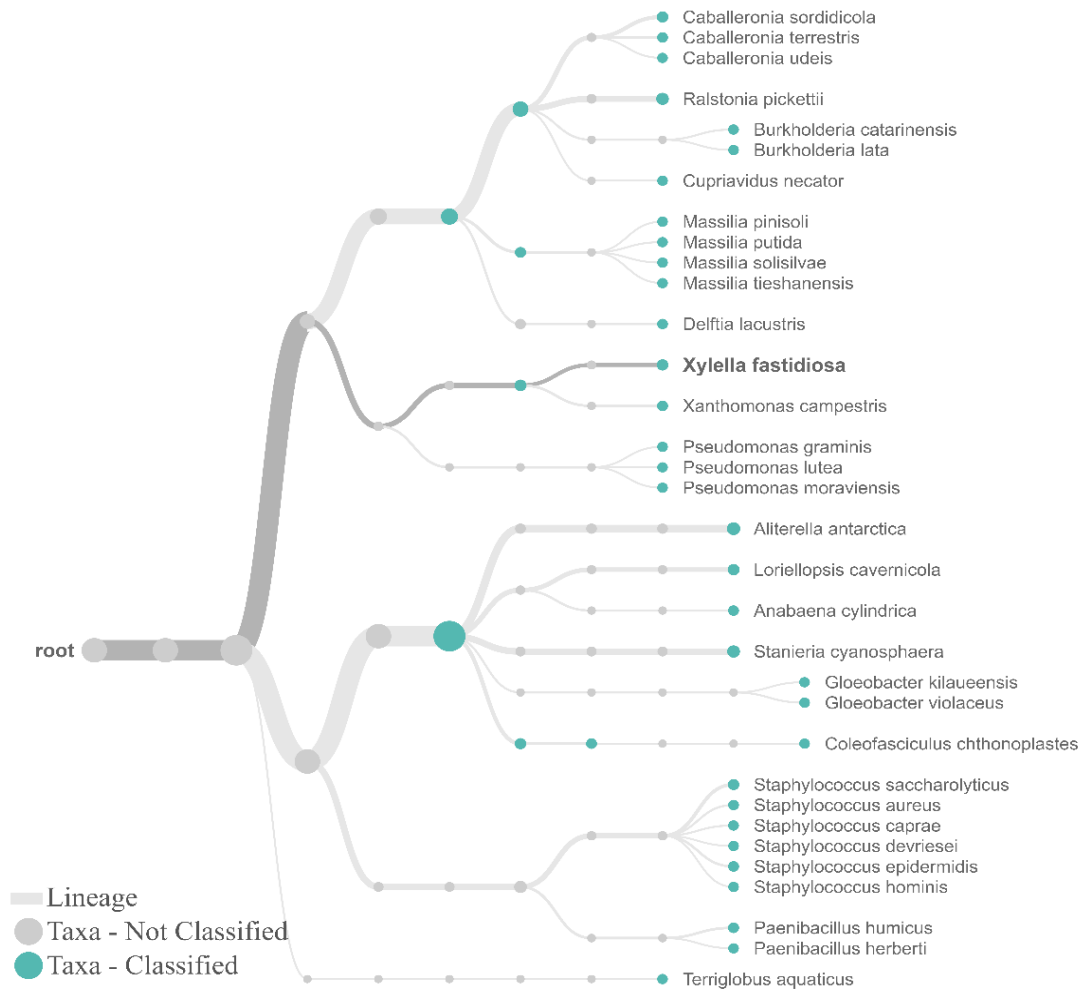


Figura 29. Árvore filogenética ao nível da espécie da amostra 197, baseada na análise completa do gene 16S rRNA obtido através da plataforma *MinION* e analisado com o *software* EPI2ME.

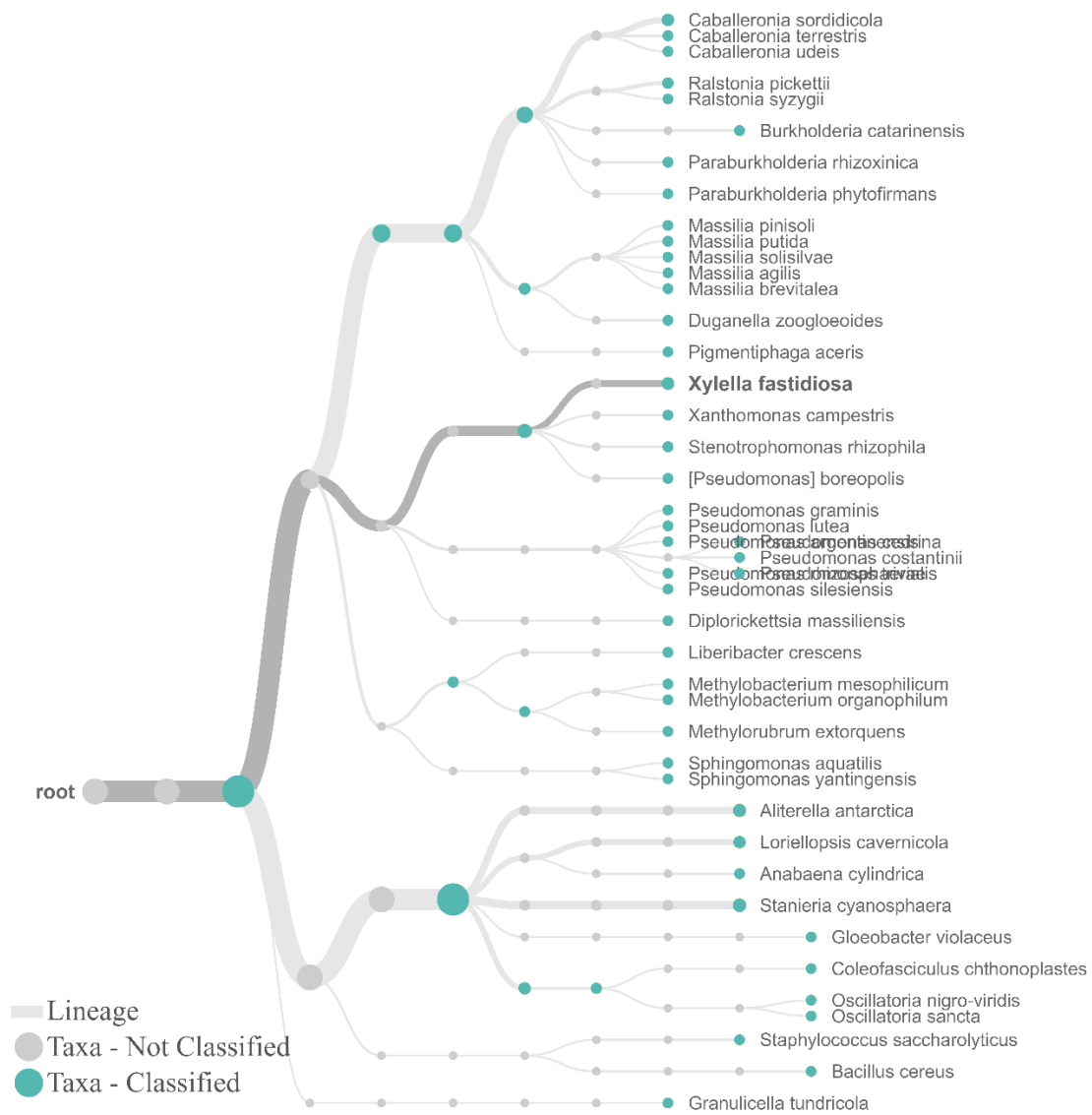


Figura 30. Árvore filogenética ao nível da espécie da amostra 198F, baseada na análise completa do gene 16S rRNA obtido através da plataforma *MinION* e analisado com o *software* EPI2ME.

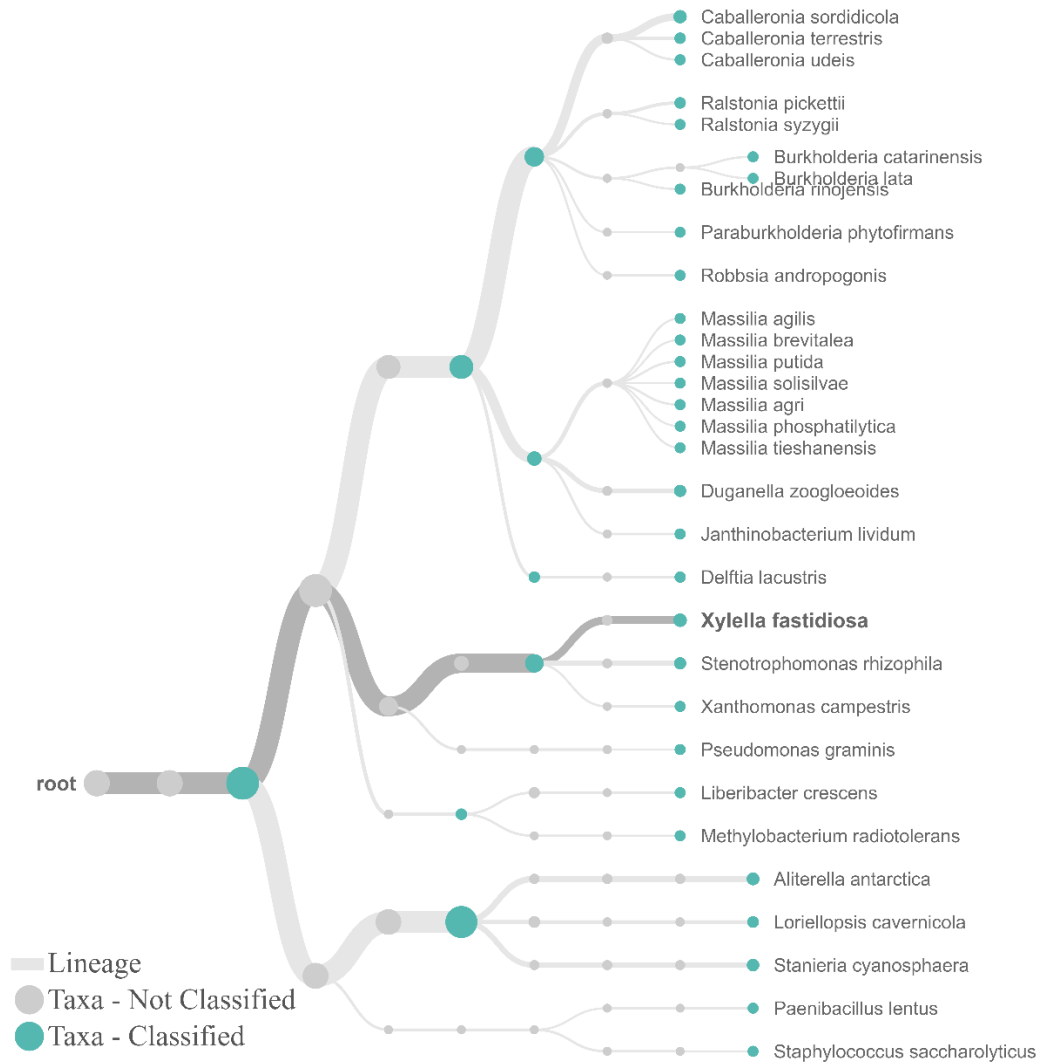


Figura 31. Árvore filogenética ao nível da espécie da amostra 198R, baseada na análise completa do gene 16S rRNA obtido através da plataforma *MinION* e analisado com o *software* EPI2ME.

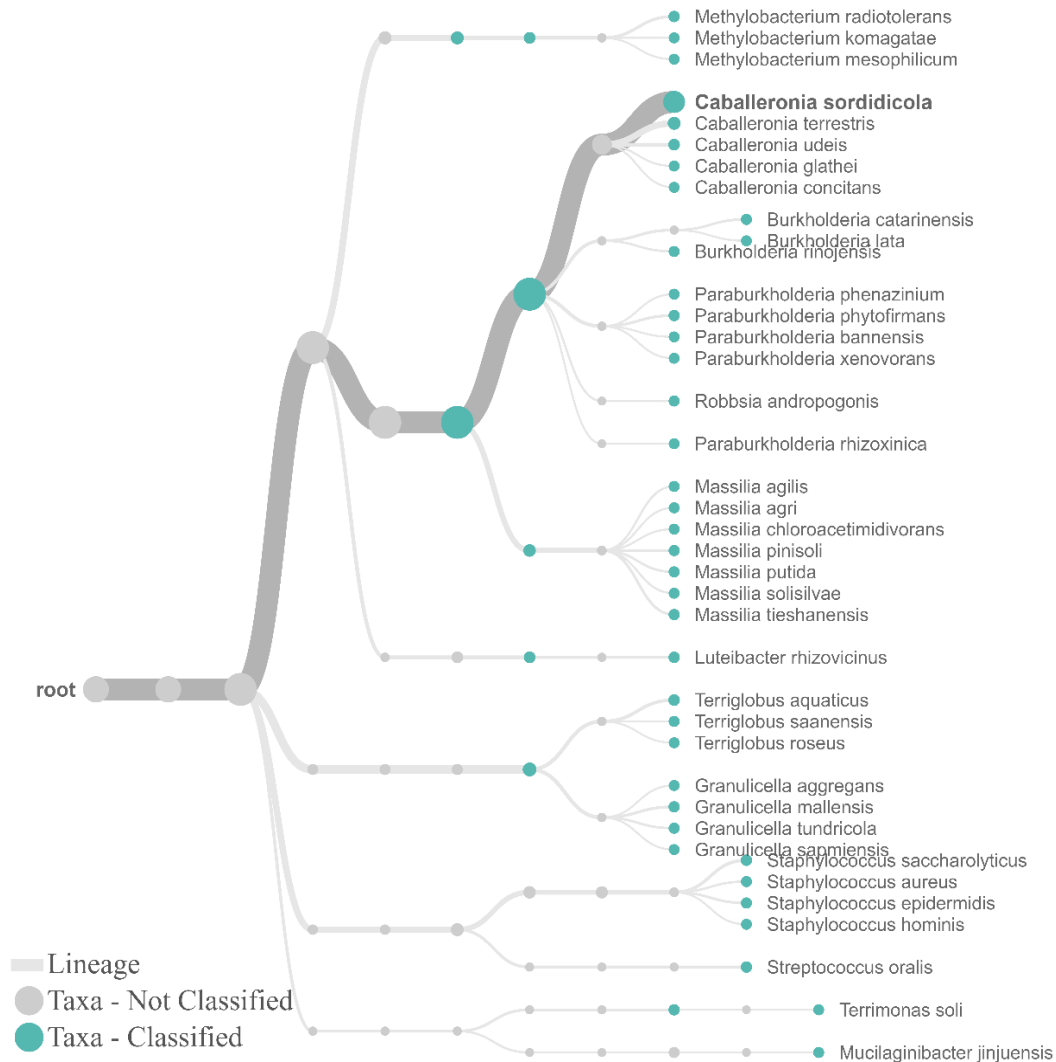


Figura 32. Árvore filogenética ao nível da espécie da amostra 199R, baseada na análise completa do gene 16S rRNA obtido através da plataforma *MinION* e analisado com o *software* EPI2ME.

Na tabela 11 encontram-se representadas as espécies com maior número de leituras de cada amostra. A amostra 42R e 199R, pertencem ao mesmo hospedeiro (*Adenocarpus sp.*). De forma geral, possuem as mesmas espécies, contudo não partilham das mesmas espécies dominantes, à exceção da *C. sordidicola* e *C. terrestris*. O mesmo não se verifica com a amostra 46F e 197, ambas pertencem ao mesmo hospedeiro (*Gazania sp.*) e possuem em comum as mesmas espécies dominantes, nomeadamente, *X. fastidiosa*, *S. cianosphaera*, *A. antarctica* e *L. cavernicola*.

Relativamente à amostra 45, pertencente ao hospedeiro *Dimorphoteca*, verificou-se que as espécies dominantes são diferentes entre folhas e ramos. Das cinco espécies com mais leituras apenas têm em comum *X. fastidiosa* e *R. pickettii*, sendo que esta espécie se encontrou presente em todas as amostras.

Na amostra 193 não foi detetada *Xf* no PCR em tempo real, contudo foi identificada por sequenciação apresentando uma das maiores leituras, tanto em folhas como em ramos. Neste caso, verificou-se que das cinco espécies com mais leituras, quatro são comuns em folhas e em ramos, nomeadamente, *A. antarctica*, *X. fastidiosa*, *S. cyanosphaera* e *C. sordidicola*.

Fazendo uma comparação entre a amostra 45 (folhas e ramos) e a amostra 193 (folhas e ramos), ambas amostras da mesma espécie de hospedeiro, porém colhidas em zonas de foco diferentes, verificam-se algumas diferenças entre as espécies, sobretudo porque na amostra 193 as espécies dominantes são cianobactérias, nomeadamente *A. antarctica*, *S. cyanosphaera* e *L. cavernicola*.

A diversidade de microrganismos presentes em amostras do mesmo hospedeiro pode ser diferente quando a colheita é realizada em zonas de foco distintas, contudo são necessários mais estudos, com um maior número de amostras e com hospedeiros que não pertençam a zonas infetadas por *Xf*.

Em relação à amostra 43F e 85, pertencentes ao hospedeiro *Lavandula dentata* e *Cytisus scoparius*, respetivamente, não é possível tirar conclusões, uma vez que só foi analisada uma amostra por hospedeiro.

Tabela 11. Informação sobre a amostra, o hospedeiro e as respectivas cinco espécies com maior abundância relativa.

<b>Amostra</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Espécies Prevalentes</b>				
42R	<i>Adenocarpus sp.</i>	<i>Caballeronia sordidicola</i>	<i>Caballeronia terrestris</i>	<i>Massilia putida</i>	<i>Burkholderia catarinensis</i>	<i>Massilia pinisoli</i>
43F	<i>Lavandula dentata</i>	<i>Ralstonia pickettii</i>	<i>Bacillus mycoides</i>	<i>Delftia lacustris</i>	<i>Staphylococcus epidermis</i>	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>
45F	<i>Dimorphoteca</i>	<i>Xylella fastidiosa</i>	<i>Ralstonia pickettii</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>Duganella zoogloeoides</i>	<i>Delftia lacustris</i>
45R	<i>Dimorphoteca</i>	<i>Xylella fastidiosa</i>	<i>Ralstonia pickettii</i>	<i>Stanieria cyanosphaera</i>	<i>Aliterella antarctica</i>	<i>Loriellopsis cavernicola</i>
46F	<i>Gazania sp.</i>	<i>Xylella fastidiosa</i>	<i>Stanieria cyanosphaera</i>	<i>Aliterella antarctica</i>	<i>Loriellopsis cavernicola</i>	<i>Caballeronia sordidicola</i>
85	<i>Cytisus scoparius</i>	<i>Xylella fastidiosa</i>	<i>Liberibacter crescens</i>	<i>Diplorickettsia massiliensis</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>Pseudomonas boreopolis</i>
193F	<i>Dimorphoteca</i>	<i>Aliterella antarctica</i>	<i>Xylella fastidiosa</i>	<i>Stanieria cyanosphaera</i>	<i>Caballeronia sordidicola</i>	<i>Ralstonia pickettii</i>
193R	<i>Dimorphoteca</i>	<i>Aliterella antarctica</i>	<i>Stanieria cyanosphaera</i>	<i>Xylella fastidiosa</i>	<i>Loriellopsis cavernicola</i>	<i>Caballeronia sordidicola</i>
197	<i>Gazania sp.</i>	<i>Aliterella antarctica</i>	<i>Stanieria cyanosphaera</i>	<i>Ralstonia pickettii</i>	<i>Loriellopsis cavernicola</i>	<i>Xylella fastidiosa</i>
198F	<i>Dimorphoteca</i>	<i>Stanieria cyanosphaera</i>	<i>Aliterella antarctica</i>	<i>Xylella fastidiosa</i>	<i>Caballeronia sordidicola</i>	<i>Loriellopsis cavernicola</i>
198R	<i>Dimorphoteca</i>	<i>Xylella fastidiosa</i>	<i>Caballeronia sordidicola</i>	<i>Aliterella antarctica</i>	<i>Stanieria cyanosphaera</i>	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>
199R	<i>Adenocarpus sp.</i>	<i>Caballeronia sordidicola</i>	<i>Caballeronia terrestris</i>	<i>Caballeronia udeis</i>	<i>Terriglobus aquaticus</i>	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>



## **Capítulo 5 - Conclusões e Perspetivas Futuras**



*Xylella fastidiosa* é uma ameaça emergente em todo o mundo, originando surtos graves e com enormes prejuízos. Uma vez estabelecida é muito difícil controlar a sua disseminação. Até ao momento não há nenhuma solução para eliminar este patógeno e controlar os insetos vetores.

O diagnóstico de doenças causadas por *Xf* é difícil e na maioria das vezes tardio. Essa dificuldade é aumentada, pois as plantas infetadas podem permanecer assintomáticas por longos períodos de tempo, o que pode estar associado a baixas concentrações bacterianas e a uma distribuição desigual dos patógenos nas plantas. Apesar dos recentes avanços na biologia molecular e do desenvolvimento de *kits* de identificação mais específicos, a deteção e identificação de estirpes bacterianas continua a ser uma tarefa difícil e com algumas limitações. Perante isto, torna-se necessário e urgente desenvolver estratégias para controlar os insetos vetores, bem como desenvolver ferramentas específicas e sensíveis capazes de detetar precocemente esta bactéria.

O presente trabalho visou caracterizar a diversidade de microrganismos endófitos em vários hospedeiros presentes em distintas zonas de foco em Portugal e suscetíveis à infeção por *Xf*. Para o efeito, recorreu-se à amplificação e sequenciação do gene 16S rRNA. Foi verificada a presença de *X. fastidiosa* e a diversidade de bactérias endófitas em folhas e ramos de vários hospedeiros assintomáticos, *a priori* saudáveis e infetados. Contudo, aquando da análise através da plataforma EPI2ME verificou-se a presença de *Xf* em todas as amostras, algo que não era esperado de acordo com ensaios preliminares por PCR em tempo real. Perante isto, a comparação entre a comunidade endófitas de plantas saudáveis *versus* plantas doentes para identificar grupos relevantes na epidemiologia da doença deixou de ser possível com estas amostras. Embora não fosse esperado, *X. fastidiosa* foi detetada em todas as amostras. Esta foi identificada por sequenciação e obteve na maioria das amostras o maior número de leituras (Tabela 11).

Os resultados da análise da diversidade estrutural das comunidades endófitas mostraram que, de forma geral, as amostras partilham as mesmas espécies, porém na maioria dos casos não partilham as mesmas espécies dominantes.

*Ralstonia pickettii* está presente em todas as amostras, tal como a *Caballeronia sordidicola*, que só não se encontra presente na amostra 85. Salienta-se a importância funcional de ambas as espécies no microbioma, a primeira pela sua capacidade de degradar substâncias tóxicas, tornando-se uma excelente candidata para biorremediação e a segunda pela função de fixar o nitrogénio e promover o crescimento das plantas (Ryan *et al.*, 2007; Puri *et al.*, 2020). Possivelmente a ausência de sintomas nestas plantas silvestres, e a ausência de sinais de declínio podem estar relacionadas com a presença de determinados grupos taxonómicos na comunidade endófitas que pela sua função podem promover a modelação da infeção.

É também importante salientar que este é o primeiro estudo em plantas silvestres que não apresentam sintomas nem declínio, pelo que a presença destas bactérias podem ser um ponto de partida para ajudar a compreender o impacto de *Xf* na disbiose.

Pode concluir-se que um dos objetivos deste trabalho foi alcançado, uma vez que foi possível identificar microrganismos endófitos, nomeadamente, *Methylobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pantoea* e *Xanthomonas*, em diferentes hospedeiros e utilizando a nova tecnologia de sequenciação.

Numa visão para o futuro, apesar dos resultados obtidos na análise MLST não terem sido ambicionados, pretende-se dar continuidade a este estudo, isolar *Xf* e possivelmente caracterizá-la geneticamente, usando a abordagem MLST através da tecnologia ONT com uns *primers* mais específicos para a identificação da subespécie e possivelmente usando o DNA extraído da bactéria. Em paralelo, será realizada a análise de metagenómica (Román-Reyna *et al.*, 2021; Johnson *et al.*, 2022) na amostra com maior abundância relativa de *Xf* de forma a obter informação genómica sobre a bactéria e inferir a sua identificação e potenciais determinantes de virulência.

Poderá também realizar-se novamente o estudo do microbioma endófito de plantas suscetíveis à infeção por *Xf* usando um maior número de amostras e hospedeiros que não pertençam a zonas infetadas por *Xf* para uma comparação real entre plantas saudáveis *versus* doentes, com a finalidade de analisar objetivamente o impacto da presença de *Xf*.

## **Capítulo 6 – Bibliografía**



- Adams, D. G., Bergman, B., Nierzwicki-Bauer, S. A., Duggan, P. S., Rai, A. N., Schüßler, A. (2013). Cyanobacterial-Plant Symbioses. *The Prokaryotes* (359–400). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30194-0\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30194-0_17)
- Almeida, R. P. P., Blua, M. J., Lopes, J. R. S., Purcell, A. H. (2005). Vector transmission of *Xylella fastidiosa*: Applying fundamental knowledge to generate disease management strategies. *Annals of the Entomological Society of America*, 98(6), 775–786. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2005\)098\[0775:VTOXFA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2005)098[0775:VTOXFA]2.0.CO;2)
- Almeida, R. P., Coletta-Filho, H. D., Lopes, J. R. (2014). *Xylella fastidiosa*. *Manual of Security Sensitive Microbes and Toxins*, 34(2), 841–850. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2004.00718.x>
- Azevedo, J. L., Araújo, W. L., Lacava, P. T. (2016). The diversity of citrus endophytic bacteria and their interactions with *Xylella fastidiosa* and host plants. *Genetics and Molecular Biology*, 39(4), 476–491. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0056>
- Bach, E., Sant’Anna, F. H., Magrich dos Passos, J. F., Balsanelli, E., de Baura, V. A., Pedrosa, F. de O., de Souza, E. M., Passaglia, L. M. P. (2017). Detection of misidentifications of species from the Burkholderia cepacia complex and description of a new member, the soil bacterium Burkholderia catarinensis sp. nov. *Pathogens and Disease*, 75(6). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx076>
- Bach, E., Sant’Anna, F. H., Seger, G. D. dos S., Passaglia, L. M. P. (2022). Pangenome inventory of Burkholderia sensu lato, Burkholderia sensu stricto, and the Burkholderia cepacia complex reveals the uniqueness of Burkholderia catarinensis. *Genomics*, 114(1), 398–408. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.11.011>
- Baldi, P., La Porta, N. (2017). *Xylella fastidiosa*: Host range and advance in molecular identification techniques. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00944>
- Blaustein, R. A., Lorca, G. L., Meyer, J. L., Gonzalez, C. F., Teplitski, M. (2017). Defining the Core Citrus Leaf- and Root-Associated Microbiota: Factors Associated with Community Structure and Implications for Managing Huanglongbing (Citrus Greening) Disease. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(11). <https://doi.org/10.1128/AEM.00210-17>

- Bragard, C., Dehnen-Schmutz, K., Di Serio, F., Gonthier, P., Jacques, M. A., Jaques Miret, J. A., Justesen, A. F., MacLeod, A., Magnusson, C. S., Milonas, P., Navas-Cortés, J. A., Potting, R., Reignault, P. L., Thulke, H. H., van der Werf, W., Vicent Civera, A., Yuen, J., Zappalà, L., Boscia, D., ... Parnell, S. (2019). Update of the Scientific Opinion on the risks to plant health posed by *Xylella fastidiosa* in the EU territory. *EFSA Journal*, 17(5). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5665>
- Camino, C., Calderón, R., Parnell, S., Dierkes, H., Chemin, Y., Román-Écija, M., Beck, P. S. A. (2021). Detection of *Xylella fastidiosa* in almond orchards by synergic use of an epidemic spread model and remotely sensed plant traits. *Remote Sensing of Environment*, 260. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2021.112420>
- Cardone, G., Digiario, M., Djelouah, K., El Bilali, H., Frem, M., Fucilli, V., Ladisa, G., Rota, C., Yaseen, T. (2021). Potential socio-economic impact of *Xylella fastidiosa* in the near east and north africa (Nena): Risk of introduction and spread, risk perception and socio-economic effects. *New Medit*, 20(2), 27–52. <https://doi.org/10.30682/nm2102c>
- Cariddi, C., Saponari, M., Boscia, D., De Stradis, A., Loconsole, G., Nigro, F., Porcelli, F., Potere, O., Martelli, G. P. (2014). Isolation of a *Xylella fastidiosa* strain infecting olive and oleander in Apulia, Italy. *Journal of Plant Pathology*, 96(2), 425–429. <https://doi.org/10.4454/JPP.V96I2.024>
- Caugant, D. A. (2001). From Multilocus Enzyme Electrophoresis to Multilocus Sequence Typing. *New Approaches for the Generation and Analysis of Microbial Typing Data*. 299–349. <https://doi.org/10.1016/B978-044450740-2/50013-7>
- Cummings, P. J., Olszewicz, J., Obom, K. M. (2017). Nanopore DNA sequencing for metagenomic soil analysis. *Journal of Visualized Experiments*, 130, 1–8. <https://doi.org/10.3791/55979>
- D'attoma, G., Morelli, M., Saldarelli, P., Saponari, M., Giampetruzzi, A., Boscia, D., Savino, V. N., Fuente, L. D. La, Cobine, P. A. (2019). Ironic differences between susceptible and resistant olive cultivars infected by *Xylella fastidiosa* in the outbreak area of salento, Italy. *Pathogens*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/pathogens8040272>
- Delbianco, A., Gibin, D., Pasinato, L., Morelli, M. (2022). Update of the *Xylella* spp. host plant database – systematic literature search up to 30 June 2021. *EFSA Journal*, 20(1), 1–67. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7039>

Denancé, N., Legendre, B., Briand, M., Olivier, V., de Boisseson, C., Poliakoff, F., Jacques, M. A. (2017). Several subspecies and sequence types are associated with the emergence of *Xylella fastidiosa* in natural settings in France. *Plant Pathology*, 66(7), 1054–1064. <https://doi.org/10.1111/ppa.12695>

Despacho n.º 6/G/2022 de 1 de fevereiro. Atualização da Zona Demarcada da Área Metropolitana do Porto para *Xylella fastidiosa*. Direção Geral de Alimentação e Veterinária.

Despacho n.º 12/G/2022 de 21 de fevereiro. Redução da Zona Demarcada de Tavira para *Xylella fastidiosa*. Direção Geral de Alimentação e Veterinária.

Despacho n.º 40/2021 de 9 de agosto. Estabelecimento da Zona Demarcada da Área Metropolitana de Lisboa para *Xylella fastidiosa*. Direção Geral de Alimentação e Veterinária.

Dingle, T. C., MacCannell, D. R. (2015). Molecular Strain Typing and Characterisation of Toxigenic *Clostridium difficile*. *Methods in Microbiology*. 329–357. <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2015.07.001>

Dupas, E., Legendre, B., Olivier, V., Poliakoff, F., Manceau, C., Cunty, A. (2019). Comparison of real-time PCR and droplet digital PCR for the detection of *Xylella fastidiosa* in plants. *Journal of Microbiological Methods*, 162, 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.05.010>

EPPO. (2019). PM 7/24 (4) *Xylella fastidiosa*. *EPPO Bulletin*, 49(2), 175–227. <https://doi.org/10.1111/epp.12575>

European Commission. (2015). Guidelines for the survey of *Xylella fastidiosa* in the Union territory. *European Commission Directorate General for Health and Food Safety*, December, 1–8. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3989.3>

European Food Safety Authority. (2013). Statement of EFSA on host plants, entry and spread pathways and risk reduction options for *Xylella fastidiosa* Wells *et al.* *EFSA Journal*, 11(11), 1–50. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3468>

Faino, L., Scala, V., Albanese, A., Modesti, V., Grottoli, A., Pucci, N., Doddi, A., L'Aurora, A., Tatulli, G., Reverberi, M., Loreti, S. (2021). Nanopore sequencing for the detection and identification of *Xylella fastidiosa* subspecies and sequence types from naturally infected plant material. *Plant Pathology*, 70(8), 1860–1870. <https://doi.org/10.1111/ppa.13416>

- Farzin, H., Jinghong, L., Hai-Chen, W., Xing-Jie, L., Peixuan, G. (2013). Solid-State and biological nanopore for real-time sensing of single chemical and sequencing of DNA. *Nano Today*, 8(1), 56–74. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2012.12.008>.
- Feng, G.-D., Yang, S.-Z., Li, H.-P., Zhu, H.-H. (2016). *Massilia putida* sp. nov., a dimethyl disulfide-producing bacterium isolated from wolfram mine tailing. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(1), 50–55. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000670>
- Figueira, D., Garcia, E., Ares, A., Tiago, I., Veríssimo, A., Costa, J. (2020). Genetic diversity of *pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae*: Seasonal and spatial population dynamics. *Microorganisms*, 8(6), 1–18. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060931>
- Fitzpatrick, C. R., Lu-Irving, P., Copeland, J., Guttman, D. S., Wang, P. W., Baltrus, D. A., Dlugosch, K. M., Johnson, M. T. J. (2018). Chloroplast sequence variation and the efficacy of peptide nucleic acids for blocking host amplification in plant microbiome studies. *Microbiome*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0534-0>
- Fouz, M. F., & Appella, D. H. (2020). PNA clamping in nucleic acid amplification protocols to detect single nucleotide mutations related to cancer. *Molecules*, 25(4). <https://doi.org/10.3390/molecules25040786>
- Fujiyoshi, S., Muto-Fujita, A., Maruyama, F. (2020). Evaluation of PCR conditions for characterizing bacterial communities with full-length 16S rRNA genes using a portable nanopore sequencer. *Scientific Reports*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69450-9>
- Godefroid, M., Cruaud, A., Streito, J. C., Rasplus, J. Y., Rossi, J. P. (2019). *Xylella fastidiosa*: climate suitability of European continent. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45365-y>
- Goldfeder, R. L., Wall, D. P., Khoury, M. J., Ioannidis, J. P. A., Ashley, E. A. (2017). Human Genome Sequencing at the Population Scale: A Primer on High-Throughput DNA Sequencing and Analysis. *American Journal of Epidemiology*, 186(8), 1000–1009. <https://doi.org/10.1093/aje/kww224>
- Gould, A. B., & Lashomb, J. H. (2007). Bacterial leaf scorch (BLS) of shade trees. *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2007-0403-07>
- Grada, A., & Weinbrecht, K. (2013). Next-generation sequencing: Methodology and application. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(8), 1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.248>

- Greco, D., Aprile, A., De Bellis, L., Luvisi, A. (2021). Diseases Caused by *Xylella fastidiosa* in Prunus Genus: An Overview of the Research on an Increasingly Widespread Pathogen. *Frontiers in Plant Science*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.712452>
- Gupta, P. K. (2008). Single-molecule DNA sequencing technologies for future genomics research. *Trends in Biotechnology*, 26(11), 602–611. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.07.003>
- Hanani, A., Valentini, F., Sanzani, S. M., Santoro, F., Minutillo, S. A., Gallo, M., Cavallo, G., Mourou, M., Moujabber, M. El, Onghia, A. M. D., Davino, S. W. (2022). Community Analysis of Culturable Sapwood Endophytes from Apulian Olive Varieties with Different Susceptibility to *Xylella fastidiosa*. *Agronomy*, 12(9), 1–16.
- Harper, S. J., Ward, L. I., Clover, G. R. G. (2010). Development of LAMP and real-time PCR methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for quarantine and field applications. *Phytopathology*, 100(12), 1282–1288. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-10-0168>
- Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
- Heliodoro, C. I. M. (2017). Infecção invasiva por *Haemophilus influenzae*: Caracterização fenotípica e molecular e estudo da virulência de estirpes isoladas em Portugal. Tese de mestrado em Biologia Humana e Ambiente. Departamento de Biologia Animal. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.
- Janahiraman, V., Anandham, R., Kwon, S. W., Sundaram, S., Karthik Pandi, V., Krishnamoorthy, R., Kim, K., Samaddar, S., & Sa, T. (2016). Control of Wilt and Rot Pathogens of Tomato by Antagonistic Pink Pigmented Facultative Methylophilic *Delftia lacustris* and *Bacillus* spp. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01626>
- Janse, J. D., Obradovic, A. (2010). *Xylella fastidiosa*: Its biology, diagnosis, control and risks. *Journal of Plant Pathology*, 92(1), 35–48.
- Jeger, M., Caffier, D., Candresse, T., Chatzivassiliou, E., Dehnen-Schmutz, K., Gilioli, G., Grégoire, Bragard, C. (2018). Updated pest categorisation of *Xylella fastidiosa*. *EFSA Journal*, 16(7). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5357>
- Johnson, M. A., Liu, H., Bush, E., Sharma, P., Yang, S., Mazloom, R., Heath, L. S., Nita, M., Li, S., & Vinatzer, B. A. (2022). Investigating plant disease outbreaks with long-read metagenomics: sensitive detection and highly resolved phylogenetic reconstruction applied to *Xylella fastidiosa*. *Microbial Genomics*, 8(5). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000822>

- Jolley, K. A., Bray, J. E., Maiden, M. C. J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Research*, 3(124), 1–20. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
- Kollmen, J., & Strieth, D. (2022). The Beneficial Effects of Cyanobacterial Co-Culture on Plant Growth. *Life*, 12(2), 223. <https://doi.org/10.3390/life12020223>
- Lamb, H. J., Hayes, B. J., Nguyen, L. T., Ross, E. M. (2020). The future of livestock management: A review of real-time portable sequencing applied to livestock. *Genes*, 11(12), 1–27. <https://doi.org/10.3390/genes11121478>
- Leggett, R. M., & Clark, M. D. (2017). A world of opportunities with nanopore sequencing. *Journal of Experimental Botany*, 68(20), 5419–5429. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx289>
- Liefting, L. W., Waite, D. W., Thompson, J. R. (2021). Application of oxford nanopore technology to plant virus detection. *Viruses*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/v13081424>
- Lin, B., Hui, J., Mao, H. (2021). Nanopore technology and its applications in gene sequencing. *Biosensors*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/bios11070214>
- Liu, Y.-C., Wang, S.-C., Yu, Y.-J., Fung, K.-M., Yang, M.-T., Tseng, Y.-H., Tsai, S.-F., Sun, H. S., Lyu, P.-C., Chou, S.-H. (2015). Complete Genome Sequence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Strain 17 from Taiwan. *Genome Announcements*, 3(6). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01466-15>
- Madhaiyan, M., Selvakumar, G., Alex, T. H., Cai, L., Ji, L. (2021). Plant Growth Promoting Abilities of Novel Burkholderia-Related Genera and Their Interactions With Some Economically Important Tree Species. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.618305>
- McCabe, M., Cormican, P., Johnston, D., Earley, B. (2018). Simultaneous detection of DNA and RNA virus species involved in bovine respiratory disease by PCR-free rapid tagmentation-based library preparation and MinION nanopore sequencing. *BioRxiv*, 269936. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/269936>
- McGinn, S., & Gut, I. G. (2013). DNA sequencing - spanning the generations. *New Biotechnology*, 30(4), 366–372. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2012.11.012>
- Morelli, M., García-Madero, J. M., Jos, Á., Saldarelli, P., Dongiovanni, C., Kovacova, M., Saponari, M., Arjona, A. B., Hackl, E., Webb, S., Compant, S. (2021). *Xylella fastidiosa* in olive: A review of control attempts and current management. *Microorganisms*, 9(8), 1–21. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081771>

Moreno, A. C. A. (2013) Diagnóstico Molecular na era da sequenciação de 3ª geração e da PCR digital. Tese de mestrado em Ciências Farmacêuticas. Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa.

Naranjo, E., Merfa, M. V., Santra, S., Ozcan, A., Johnson, E., Cobine, P. A., & De La Fuente, L. (2020). Zinkicide Is a ZnO-Based Nanoformulation with Bactericidal Activity against *Liberibacter crescens* in Batch Cultures and in Microfluidic Chambers Simulating Plant Vascular Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(16). <https://doi.org/10.1128/AEM.00788-20>

Ouyang, P., Arif, M., Fletcher, J., Melcher, U., Ochoa Corona, F. M. (2013). Enhanced reliability and accuracy for field deployable bioforensic detection and discrimination of *Xylella fastidiosa subsp. pauca*, causal agent of citrus variegated chlorosis using Razor Ex technology and taqman quantitative PCR. *PLoS ONE*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081647>

Oxford Nanopore Technologies. (2022a). Acedido a 17 de março de 2022. Disponível em <https://nanoporetech.com/products>

Oxford Nanopore Technologies (2022b). Acedido a 04 de junho de 2022. Disponível em <https://nanoporetech.com/q20plus-chemistry>

Oxford Nanopore Technologies (2022c). Acedido a 25 de junho de 2022. Disponível em <https://nanoporetech.com/analyse/16s>

Pavlovic, J., Cavalieri, D., Mastromei, G., Pangallo, D., Perito, B., Marvasi, M. (2021). MinION technology for microbiome sequencing applications for the conservation of cultural heritage. *Microbiological Research*, 247, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126727>

Pareek, C. S., Smoczynski, R., Tretyn, A. (2011). Sequencing technologies and genome sequencing. *Journal of Applied Genetics*, 52(4), 413–435. <https://doi.org/10.1007/s13353-011-0057-x>

Puri, A., Padda, K. P., Chanway, C. P. (2020). Can naturally-occurring endophytic nitrogen-fixing bacteria of hybrid white spruce sustain boreal forest tree growth on extremely nutrient-poor soils? *Soil Biology and Biochemistry*, 140, 107642. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.107642>

Rapicavoli, J., Ingel, B., Blanco-Ulate, B., Cantu, D., Roper, C. (2018). *Xylella fastidiosa*: an examination of a re-emerging plant pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 19(4), 786–800. <https://doi.org/10.1111/mpp.12585>

Regulamento de Execução (UE) 2021/2285 da Comissão de 14 de dezembro de 2021. Jornal Oficial da União Europeia. Acedido em: 10 de março de 2022, em <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX:32021R2285>

Reuter, J. A., Spacek, D. V., Snyder, M. P. (2015). High-Throughput Sequencing Technologies. *Molecular Cell*, 58(4), 586–597. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.004>

Román-Reyna, V., Dupas, E., Cesbron, S., Marchi, G., Campigli, S., Hansen, M. A., Bush, E., Prarat, M., Shiplett, K., Ivey, M. L. L., Pierzynski, J., Miller, S. A., Peduto Hand, F., Jacques, M.-A., & Jacobs, J. M. (2021). Metagenomic Sequencing for Identification of *Xylella fastidiosa* from Leaf Samples. *MSystems*, 6(5). <https://doi.org/10.1128/mSystems.00591-21>

Rong, X., & Huang, Y. (2014). Multi-locus Sequence Analysis: Taking Prokaryotic Systematics to the Next Level. *Methods in Microbiology*. 221–251. <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2014.10.001>

Rozas, M., Brillet, F., Callewaert, C., Paetzold, B. (2022). MinION™ Nanopore Sequencing of Skin Microbiome 16S and 16S-23S rRNA Gene Amplicons. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.806476>

Ryan, M. P., Pembroke, J. T., Adley, C. C. (2007). *Ralstonia pickettii* in environmental biotechnology: potential and applications. *Journal of Applied Microbiology*, 103(4), 754–764. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03361.x>

Sen, P., Hoi, H., Gupta, M. (2021). Low Noise Hybrid Nanopore with Engineered OmpG and Bilayer MoS<sub>2</sub>. *ACS Applied Bio Materials*, 4(7), 5416–5424. <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c00095>

Serrano, A. C. M. (2014). Análise de genomas humanos de indivíduos portugueses. Tese de mestrado em Bioquímica. Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro.

Shariatmadari, Z., Riahi, H., Seyed Hashtroudi, M., Ghassempour, A., Aghashariatmadary, Z. (2013). Plant growth promoting cyanobacteria and their distribution in terrestrial habitats of Iran. *Soil Science and Plant Nutrition*, 59(4), 535–547. <https://doi.org/10.1080/00380768.2013.782253>

Sicard, A., Zeilinger, A. R., Vanhove, M., Schartel, T. E., Beal, D. J., Daugherty, M. P., Almeida, R. P. P. (2018). *Xylella fastidiosa*: Insights into an emerging plant pathogen. *Annual Review of Phytopathology*, 56, 181–202. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-045849>

- Singh, S. (2014). A review on possible elicitor molecules of cyanobacteria: their role in improving plant growth and providing tolerance against biotic or abiotic stress. *Journal of Applied Microbiology*, 117(5), 1221–1244. <https://doi.org/10.1111/jam.12612>
- Slatko, B. E., Gardner, A. F., Ausubel, F. M. (2018). Overview of Next Generation Sequencing technologies (and bioinformatics) in cancer. *Molecular Biology*, 122(1), 1–15. <https://doi.org/10.1002/cpmb.59.Overview>
- Subramanian, G., Barry, A. O., Ghigo, E., Raoult, D., Mediannikov, O. (2012). Antibiotic susceptibility and intracellular localization of *Diplorickettsia massiliensis*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 64(1), 48–56. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00885.x>
- Sutton, M. A., Burton, A. S., Zaikova, E., Sutton, R. E., Brinckerhoff, W. B., Bevilacqua, J. G., Weng, M. M., Mumma, M. J., Johnson, S. S. (2019). Radiation Tolerance of Nanopore Sequencing Technology for Life Detection on Mars and Europa. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41488-4>
- Vandamme, P., De Brandt, E., Houf, K., Salles, J. F., Dirk van Elsas, J., Spilker, T., LiPuma, J. J. (2013). *Burkholderia humi* sp. nov., *Burkholderia choica* sp. nov., *Burkholderia telluris* sp. nov., *Burkholderia terrestris* sp. nov. and *Burkholderia udeis* sp. nov.: *Burkholderia glathei*-like bacteria from soil and rhizosphere soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt\_12), 4707–4718. <https://doi.org/10.1099/ijs.o.048900-0>
- Vandana, U. K., Rajkumari, J., Singha, L. P., Satish, L., Alavilli, H., Sudheer, P. D. V. N., Chauhan, S., Ratnala, R., Satturu, V., Mazumder, P. B., Pandey, P. (2021). The endophytic microbiome as a hotspot of synergistic interactions, with prospects of plant growth promotion. *Biology*, 10(2), 1–29. <https://doi.org/10.3390/biology10020101>
- Vandenkoornhuysse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, 206(4), 1196–1206. <https://doi.org/10.1111/nph.13312>
- Vergine, M., Meyer, J. B., Cardinale, M., Sabella, E., Hartmann, M., Cherubini, P., De Bellis, L., Luvisi, A. (2020). The *Xylella fastidiosa*-resistant olive cultivar “Leccino” has stable endophytic microbiota during the olive quick decline syndrome (OQDS). *Pathogens*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/pathogens9010035>
- Waliullah, S., Hudson, O., Oliver, J. E., Brannen, P. M., Ji, P., Ali, M. E. (2019). Comparative analysis of different molecular and serological methods for detection of *Xylella fastidiosa* in blueberry. *PLoS ONE*, 14(9), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221903>

- Wasfi, A., Awwad, F., Ayesh, A. I. (2018). Graphene-based nanopore approaches for DNA sequencing: A literature review. *Biosensors and Bioelectronics*, 119, 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.07.072>
- Weirather, J. L., de Cesare, M., Wang, Y., Piazza, P., Sebastiano, V., Wang, X.-J., Buck, D., Au, K. F. (2017). Comprehensive comparison of Pacific Biosciences and Oxford Nanopore Technologies and their applications to transcriptome analysis. *F1000Research*, 6(1), 1–32. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10571.1>
- Weller, S. A., Elphinstone, J. G., Smith, N. C., Boonham, N., Stead, D. E. (2000). Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), 2853–2858. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.7.2853-2858.2000>
- Wells, J. M., Raju, B. C., Hung, H., Weisburg, W. G., Mandelco-paul, L., Brenner, D. J. (1987). *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov: Gram-Negative, Xylem-Limited, Fastidious Plant Bacteria Related to *Xanthomonas* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37(2), 136–143. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-2-136>
- Yaseen, T., Drago, S., Valentini, F., Toufic, E., Stampone, G., Digiario, M., D'onghia, A. M. (2015). On-site detection of *Xylella fastidiosa* in host plants and in “spy insects” using the real-time loop-mediated isothermal amplification method. *Phytopathologia Mediterranea*, 54(3), 488–496. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-15250](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-15250)
- Yi, Y., de Jong, A., Frenzel, E., Kuipers, O. P. (2017). Comparative Transcriptomics of *Bacillus mycoides* Strains in Response to Potato-Root Exudates Reveals Different Genetic Adaptation of Endophytic and Soil Isolates. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01487>
- Zhong, Y., Xu, F., Wu, J., Schubert, J., Li, M. M. (2021). Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine. *Annals of Laboratory Medicine*, 41(1), 25–43. <https://doi.org/10.3343/alm.2021.41.1.25>
- Zilber-Rosenberg, I., Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: The hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(5), 723–735. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x>