



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

Escola de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química e Bioquímica

Curso de Licenciatura em Bioquímica

Caracterização molecular e filogenética de nemátodes fitoparasitas e das suas bactérias endossimbiontes

Relatório de Estágio

Realizado por: Ricardo Andrónico

Orientador: Dr. Carlos Gutiérrez-Gutiérrez

Coorientadora: Dra. Cláudia S. L. Vicente

Évora

2024



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

Escola de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química e Bioquímica

Curso de Licenciatura em Bioquímica

Caracterização molecular e filogenética de nemátodes fitoparasitas e das suas bactérias endossimbiontes

Relatório de Estágio

Realizado por: Ricardo Andrónico

Orientador: Dr. Carlos Gutiérrez-Gutiérrez

Coorientadora: Dra. Cláudia S. L. Vicente

Évora

2024

“Este trabalho não inclui as observações do júri”

Agradecimentos

Primeiramente gostava de agradecer à Universidade de Évora pela experiência académica que presenciei ao longo destes três anos e por todos os conhecimentos que pude adquirir.

De seguida, quero agradecer aos meus orientadores, o Doutor Carlos Gutiérrez-Gutiérrez e a Doutora Cláudia Vicente pelo incentivo, pela boa disposição e principalmente por toda a ajuda que me deram ao longo deste ano difícil. Foi sem sombra de dúvidas a experiência mais desafiadora e mais enriquecedora que tive na minha formação.

Ao laboratório de Nematologia, sediado no Pólo da Mitra, por todos os profissionais lá presentes me terem recebido de braços abertos e me terem ajudado a tornar num melhor profissional.

À minha família pelo infinito apoio que me deram e nunca terem duvidado das minhas capacidades.

Aos meus pais pelo apoio, carinho, por me permitirem continuar a minha educação e nunca terem duvidado de mim.

À minha namorada por estar sempre ao meu lado nos momentos que eu mais precisava e por me ter ajudado nos inúmeros desafios.

Por fim, aos meus amigos, principalmente à “malta dos Foros”, por nunca se esquecerem de mim mesmo estando longe de casa e estarem sempre presentes quando eu mais precisava.

Resumo

Os nemátodes fitoparasitas são organismos vermiformes microscópicos, que parasitam plantas, causando danos às culturas agrícolas. Estes organismos invertebrados pertencem ao filo Nematoda e são conhecidos pela sua capacidade de penetrar nas raízes das plantas, alimentando-se de células vegetais e causando sintomas de doenças nas plantas hospedeiras. Da família Longidoridae, os nemátodes do género *Xiphinema* Cobb, 1913 são nemátodes fitoparasitas com capacidade de transmitir vírus às plantas, representando uma preocupação significativa para a agricultura devido aos danos que podem causar às culturas e aos desafios associados ao seu controlo. A importância dos endossimbiontes, como por exemplo, “*Candidatus Xiphinematobacter*”, reside na sua influência biológica e patogenicidade dos nemátodes hospedeiros, além de afetarem potencialmente a eficiência das estratégias de controlo biológico. O primeiro passo para estabelecer medidas de controlo contra esses nemátodes é a sua correta identificação taxonómica (ao nível de espécie). A presença de endossimbiontes dos géneros “*Candidatus Xiphinematobacter*” está associada ao *Xiphinema* spp. Em Portugal, a identificação destes não é ainda conhecida. Com base nesta problemática, este trabalho apresenta como principal objetivo a caracterização molecular e filogenética dos nemátodes fitoparasitas do género *Xiphinema* e respetivas bactérias endossimbiontes através da amplificação de marcadores ribossomais (28S rRNA para o nemátode, e 16S rRNA para bactérias) e mitocondrial (gene COI mtRNA). Espera-se que a caracterização molecular e filogenética dos nemátodes fitoparasitas e dos seus endossimbiontes, permita desenvolver estratégias promissoras para o seu controlo.

Palavras-Chave

Bactéria endossimbionte; Filogenia molecular; 16S rRNA; 28S rRNA; Nemátodes fitoparasitas; *Xiphinema* spp.

Abstract

Plant-parasitic nematodes are microscopic worms-like organisms that parasitize plants, causing damage to agricultural crops. These parasites belong to the phylum Nematoda and are known for their ability to penetrate plant roots, feeding on plant cells and causing disease symptoms in host plants. Of the Longidoridae family, nematodes of the genus *Xiphinema* Cobb, 1913 are plant-parasitic nematodes with the ability to transmit viroses to plants, posing a significant concern for agriculture due to the damage they can cause to crops and the associated challenges in their control. The importance of endosymbionts, such as “*Candidatus* Xiphinematobacter,” lies in their biological influence and pathogenicity in host nematodes, as well as potentially affecting the efficiency of biological control strategies. The first step in establishing control measures against these nematodes is the correct species-level identification. The presence of endosymbionts of the genus “*Candidatus* Xiphinematobacter” is associated with *Xiphinema* spp. In Portugal, there is a lack of knowledge in the identification of those endosymbionts. Based on this issue, molecular and phylogenetic characterization of plant parasitic nematodes of the genus *Xiphinema* and their endosymbiotic bacteria will be carried out, involving the amplification of ribosomal (28S rRNA for the nematode; and 16S rRNA for the bacteria) and mitochondrial markers (COI mtRNA gene). The molecular and phylogenetic characterization of plant-parasitic nematodes and their endosymbionts will allow the development of a promising strategy for their control.

Keywords

Endosymbiont bacteria; molecular phylogeny; Plant-parasitic nematodes; 16S rRNA; 28S rRNA; *Xiphinema* spp.

Índice geral

| | |
|---|-----|
| Agradecimentos | i |
| Resumo | ii |
| Abstract..... | iii |
| Índice geral | iv |
| Índice de figuras | iv |
| Índice de Tabelas | vi |
| Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos..... | vii |
| Problemática..... | 1 |
| Objetivos do Trabalho..... | 2 |
| 1. Revisão bibliográfica..... | 3 |
| 1.1. Nemátodes fitoparasitas | 3 |
| 1.1.1. Nemátodes fitoparasitas do género <i>Xiphinema</i> | 4 |
| 1.2. Bactérias endossimbiontes em <i>Xiphinema</i> spp. | 8 |
| 1.3. Caracterização molecular e filogenia de <i>Xiphinema</i> spp. e as suas bactérias endossimbiontes..... | 9 |
| 2. Metodologia..... | 12 |
| 2.1. Estratégia | 12 |
| 2.2. Procedimento Experimental | 13 |
| 2.2.1. Extração do DNA..... | 13 |
| 2.2.2. Amplificação dos genes de interesse por PCR..... | 15 |
| 2.2.3. Eletroforese em gel de agarose | 17 |
| 2.2.4. Purificação dos produtos de PCR e sequenciação | 18 |
| 2.2.5. Análise de sequências e filogenia..... | 19 |
| 2.3. Equipamento | 20 |
| 2.4. Reagentes | 20 |
| 2.5. Diagrama do Trabalho | 21 |

| | | |
|---------------|--|-----------|
| 3. | Resultados e Discussão | 22 |
| 3.1. | Identificação taxonómica dos nemátodes em estudo e dos respetivos endossimbiontes | 22 |
| 3.1.1. | Amplificação do gene 16S rRNA dos endossimbiontes em estudo | 22 |
| 3.1.2. | Amplificação do gene 28S rRNA dos nemátodes em estudo | 23 |
| 3.1.3. | Amplificação do gene COI mtRNA dos nemátodes em estudo | 24 |
| 3.2. | Análise das sequências e filogenia | 26 |
| 3.2.1. | Análise da sequência e filogenia do <i>Xiphinema</i> do Alentejo (AL02) | 26 |
| 3.2.2. | Análise da sequência e filogenia do <i>Xiphinema</i> de Lisboa (LISB5)..... | 29 |
| 4. | Conclusão | 34 |
| 5. | Referências Bibliográficas | 35 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. 1 - Principais nemátodes fitoparasitas (Adaptado de Jones <i>et al.</i> , 2013)..... | 3 |
| Figura 1. 2 - Morfologia geral (a) e sistema reprodutor (b) de uma espécie tipo fêmea do grupo <i>Xiphinema americanum</i> (Adaptado de Palomares-Rius <i>et al.</i> , 2016) | 5 |
| Figura 1. 3 - Representação da região anterior do corpo de um nemátode-adaga (<i>Xiphinema</i> spp.) (Adaptado de Universidade da Califórnia, 2021)..... | 6 |
| Figura 1. 4 - Esquema do ciclo de vida de um nemátode-adaga (<i>Xiphinema</i> spp.) (Adaptado de Universidade da Califórnia, 2021) | 7 |
| Figura 1. 5 - Detecção das bactérias endossimbiontes de <i>Xiphinema</i> spp. através da técnica FISH (<i>fluorescence in situ hybridization</i>) e microscopia confocal: a) fêmea característica do grupo <i>Xiphinema americanum</i> (v, vulva; st, estilete); e b) localização das bactérias nos ovários e nos intestinos (i, intestinos; ov, ovários) (Adaptado de Palomares-Rius <i>et al.</i> , 2021)..... | 9 |
| Figura 1. 6 - Cofilogenia de espécies de nemátodos (árvore de nemátodos 28S) hospedeiros e estirpes de bactérias simbiotes (endossimbiontes 16S): (a) “ <i>Candidatus Xiphinematobacter</i> ” e (b) coevolução do género de endossimbiontes da família Burkholderiaceae. (Palomares-Rius <i>et al.</i> , 2021). | 11 |
| Figura 3. 1 - Amplificação do gene 16S rRNA e análise por eletroforese. As amostras representadas são: 1 e 2 – amostras de DNA (do isolado), C+ – controlo positivo (com DNA do “NZY Tissue gDNA Isolation kit”) e C- – controlo negativo (sem DNA)..... | 22 |
| Figura 3. 2 - Amplificação do gene 28S rRNA e análise por eletroforese. As amostras representadas são: 1 e 2 – amostras de DNA (do isolado) e C- – controlo negativo (sem DNA)..... | 23 |
| Figura 3. 3 - Amplificação do gene COI mtRNA e análise por eletroforese. As amostras representadas são: 1 e 2 – amostras de DNA (do isolado) e C- – controlo negativo (sem DNA)..... | 24 |
| Figura 3. 4 - Purificação dos genes 28S rRNA e 16S rRNA e análise por eletroforese. As amostras representadas são: 1 e 2 – amostras de DNA (do gene 28S), 3 e 4 – amostras de DNA (do gene 16S) e C- – controlo negativo (sem DNA)..... | 25 |
| Figura 3. 5 - Cofilogenia de espécies de nemátodos hospedeiros 28S (a) e respetivas bactérias endossimbiontes 16S (b) (AL02). (a) Obtida através do método estatístico <i>maximum likelihood</i> com o modelo GTR+G+I e 1000 repetições de <i>bootstraps</i> . (b) Obtida através do método estatístico <i>maximum likelihood</i> com o modelo K2+G+I e 1000 repetições de <i>bootstraps</i> . Linhas a negrito representam valores de <i>bootstrap</i> ≥ 70 % e as diversas cores representam a associação específica entre hospedeiro e endossimbionte..... | 28 |
| Figura 3. 6 - Cofilogenia de espécies de nemátodos hospedeiros 28S (a) e respetivas bactérias endossimbiontes 16S (b) (LISB5). (a) Obtida através do método estatístico <i>maximum likelihood</i> com o modelo GTR+G+I e 1000 repetições de <i>bootstraps</i> . (b) Obtida através do método | |

estatístico *maximum likelihood* com o modelo K2+G+I e 1000 repetições de *bootstraps*. Linhas a negrito representam valores de *bootstrap* $\geq 70\%$ e as diversas cores representam a associação específica entre hospedeiro e endossimbionte..... 32

Figura 3. 7 - Cofilogenia de espécies de nemátodos hospedeiros COI (a) e respectivas bactérias endossimbiontes 16S (b) (LISB5). (a) Obtida através do método estatístico *maximum likelihood* com o modelo T92+G+I e 1000 repetições de *bootstraps*. (b) Obtida através do método estatístico *maximum likelihood* com o modelo K2+G+I e 1000 repetições de *bootstraps*. Linhas a negrito representam valores de *bootstrap* $\geq 70\%$ e as diversas cores representam a associação específica entre hospedeiro e endossimbionte..... 33

Índice de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 2. 1 - Composição da reação para amplificação por PCR do gene 28S rRNA | 15 |
| Tabela 2. 2 - Composição da reação para amplificação por PCR do gene 16S rRNA | 15 |
| Tabela 2. 3 - Composição da reação para amplificação por PCR do gene COI mtRNA..... | 15 |
| Tabela 2. 4 - Informação sobre os <i>primers</i> usados no PCR..... | 16 |
| Tabela 3. 1 - Identificação taxonómica do <i>Xiphinema</i> sp. AL02 e do respetivo endossimbionte, utilizando os marcadores moleculares 16S rRNA e 28S rRNA | 26 |
| Tabela 3. 2 - Identificação taxonómica do <i>Xiphinema</i> sp. LISB5 e do respetivo endossimbionte, utilizando os marcadores moleculares 16S rRNA, 28S rRNA e COI mtRNA..... | 29 |

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

COI – do inglês “cytochrome c oxidase subunit I”

DNA – do inglês “Deoxyribonucleic Acid”

mtRNA – do inglês “Mitochondrial Ribonucleic Acid”

PCR – do inglês “Polymerase chain reaction”

RNA – do inglês “Ribonucleic Acid”

rRNA- do inglês “Ribossomal Ribonucleic Acid”

TBE – do inglês “Tris-Borate-EDTA”

Primer F – do inglês “Forward primer”

Primer R – do inglês “Reverse primer”

gDNA – do inglês “Genomic deoxyribonucleic acid”

GFLV – do inglês “*Grapevine fanleaf virus*”

RFLP – do inglês “Restriction Fragment Length Polymorphism”

rpm – rotações por minuto

μL – microlitros

H₂O – água

dH₂O – água destilada

ddH₂O – água bi-destilada

V – volts

h – hora

°C – grau Celsius

min – minuto

μg – microgramas

mL – mililitro

UV – ultravioleta

kb – kilobase

Problemática

Os nemátodes são invertebrados não segmentados e são, de longe, os animais mais abundantes na Terra, representando cerca de quatro quintos de todos os animais da biosfera terrestre (Pires *et al.*, 2022). A produção agrícola é uma das atividades mais importantes fornecendo uma grande fonte de matérias-primas e gerando oportunidades comerciais para outras indústrias pelo mundo inteiro. Pode ser afetada tanto positivamente como negativamente por fatores climáticos e biológicos (Kantor *et al.*, 2024). Os fatores biológicos negativos são causados por vírus, microrganismos (bactérias, fungos) ou fitoparasitas (Flores *et al.*, 2021). Estes fitoparasitas, nomeadamente *Xiphinema* e *Longidorus*, ameaçam a segurança alimentar global pois provocam danos nas plantas, interrompendo o seu metabolismo e o seu crescimento, causando perdas económicas anuais globais estimadas em 173 mil milhões de dólares (Elling, 2013; Jones *et al.*, 2013). Eles infetam culturas como vinha, tomate, batata, arroz, milho, trigo, algodão e árvores de frutos (Vicente e Espada, 2023). O controlo de nemátodes pode ser desafiador pois a eficácia dos nematicidas pode ser limitada, o uso contínuo de alguns produtos leva ao desenvolvimento de resistência dos nemátodes, reduzindo assim a eficácia dos nematicidas a longo prazo, e especialmente considerando a redução do acesso a certos nematicidas devido a preocupações ambientais e a regulamentações impostas (Poveda *et al.*, 2020). Alguns métodos de controlo biológicos alternativos aos nematicidas são por exemplo os agentes biológicos, as rizobactérias podem controlar os nemátodes por meio de competição, antibiose e produção de compostos químicos específicos. Outro método de controlo biológico é a identificação precisa, para além da identificação morfobiométrica, sendo importante usar metodologias moleculares rápidas e fiáveis para detetar corretamente e rapidamente os nemátodes (Palomares-Rius *et al.*, 2021).

Objetivos do Trabalho

O principal objetivo deste trabalho é caracterizar molecularmente e filogeneticamente isolados portugueses de nemátodes fitoparasitas do género *Xiphinema* e as respetivas bactérias endossimbiontes, extraídos de solos em Portugal Continental.

Para alcançar o objetivo principal, é necessário considerar os seguintes objetivos específicos:

- i. Identificar isolados portugueses de espécies do género *Xiphinema* recorrendo à amplificação dos marcadores moleculares 28S rRNA e COI mtRNA;
- ii. Caracterizar a diversidade de bactérias endossimbiontes associadas aos isolados portugueses através da amplificação do marcador molecular 16S rRNA;
- iii. Inferir a relação filogenética dos isolados portugueses de *Xiphinema*, e dos respetivos endossimbiontes, dentro da família Longidoridae.

1. Revisão bibliográfica

1.1. Nemátodes fitoparasitas

Os nemátodes são organismos vermiformes do filo Nematoda (Reino, Animalia). São seres eucariotas microscópios, bilateralmente simétricos, de forma alongada e geralmente cónicos em ambas as extremidades. Os nemátodes estão entre os animais mais abundantes da Terra e podem ser parasitas (de plantas, animais ou humanos) ou de vida livre, podendo ter diversos habitats como solos agrícolas ou sedimentos marinhos (Shah e Mahamood, 2017).

Entre os nemátodes parasitas, um número significativo de espécies está descrito como sendo parasita de plantas, também conhecidos por nemátodes fitoparasitas (Figura 1.1). Estes nemátodes diferenciam-se morfologicamente dos restantes por possuírem na zona bucal um estilete fino e retrátil, estrutura semelhante a uma agulha oca, com o qual perfuram e se alimentam dos nutrientes das plantas (Rocha, 2019).

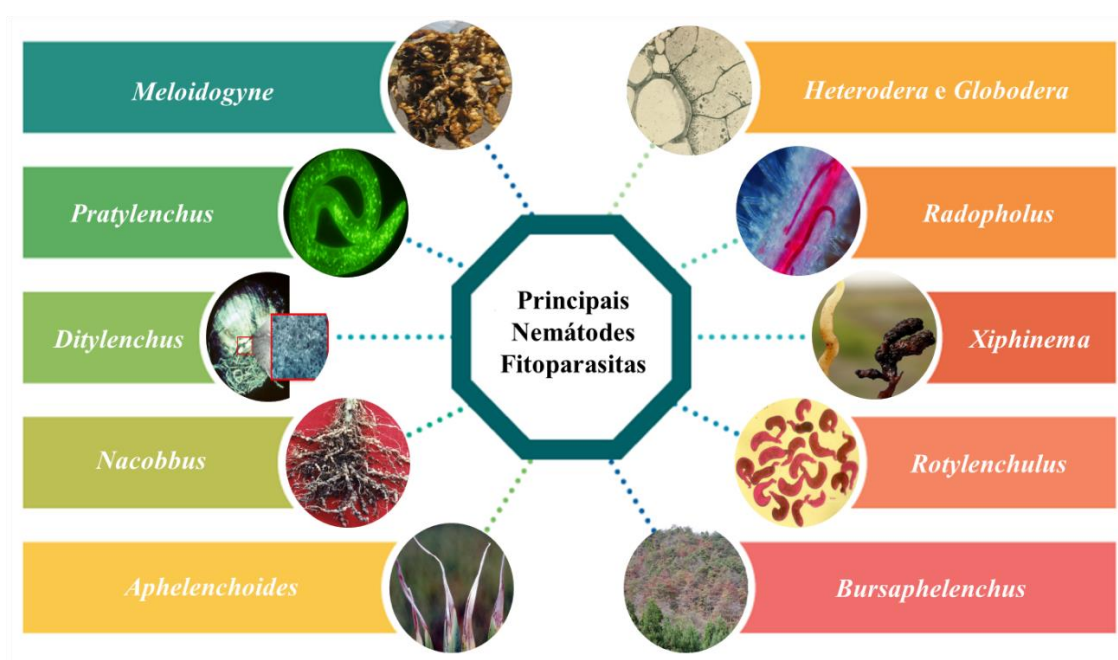


Figura 1. 1 - Principais nemátodes fitoparasitas (Adaptado de Jones *et al.*, 2013)

Os nemátodes fitoparasitas têm uma significativa importância fitossanitária e económica devido aos danos que causam às plantas cultivadas. Estes fitoparasitas alimentam-se das células vegetais do hospedeiro, podendo comprometer o seu crescimento (Poveda *et al.*, 2020). Dependendo da espécie de nemátode fitoparasita, as plantas podem apresentar diferentes sintomas, tanto na parte aérea quanto na parte

radicular. A extensão dos danos causados pelos nemátodes depende da sua densidade populacional por grama de solo (Vicente e Espada, 2023). Os danos causados pelos nemátodes fitoparasitas resultam em perdas económicas anuais significativas estimadas em 173 mil milhões de dólares (Elling, 2013). Isso pode afetar tanto pequenos agricultores quanto grandes operações agrícolas, reduzindo os rendimentos das culturas e, conseqüentemente, os lucros. Os nemátodes fitoparasitas são uma ameaça séria para a variedade de plantas cultivadas no mundo inteiro, já tendo sido reportado mais de 4100 nemátodes fitoparasitas que afetam as plantas de diversas maneiras (Decraemer e Hunt, 2006). As plantas infetadas por estes nemátodes fitoparasitas podem apresentar baixo crescimento, descoloração, e conseqüentemente baixo rendimento (Mo *et al.*, 2021).

1.1.1. Nemátodes fitoparasitas do género *Xiphinema*

Os nemátodes do género *Xiphinema* Cobb, 1913, comumente designados por nemátodes-adaga, pertencem à família Longidoridae Thorne, 1935 (ordem *Dorylaimida*) (Mnif e Ghribi, 2015). Estes nemátodes são ectoparasitas, isto é, são fitoparasitas que passam todo o seu ciclo de vida fora do hospedeiro, sendo o único contacto físico, a inserção do estilete no hospedeiro (Ankrom *et al.*, 2020), através do qual podem transferir o vírus de plantas do género *Nepovirus* (família Secoviridae) (Taylor e Brown, 1997). De facto, o vírus da degenerescência infecciosa, vulgarmente conhecido por urticado ou nó-curto (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV) e transmitido por *X. index* Thorne & Allen, 1950 causa uma das doenças virais mais relevantes da videira (Belval *et al.*, 2019).

O género *Xiphinema* encontra-se dividido em dois grupos: i) grupo *X. americanum* e ii) grupo *X. non-americanum*. As espécies do grupo *X. americanum* são nemátodes caracterizados por um tamanho de corpo e odontostilos pequenos (comparados com as espécies de *X. non-americanum*) que são unidos por semelhanças morfológicas na região labial e um corpo espiral relaxado, geralmente apresentando um útero pequeno com presença de bactérias endossimbiontes em algumas espécies. O grupo *X. non-americanum* é caracterizado por ter um corpo e odontostilo mais longos, geralmente apresentando úteros longos e diferenciação uterina, ilustrado na figura 1.2 (Mobasserri *et al.*, 2019).

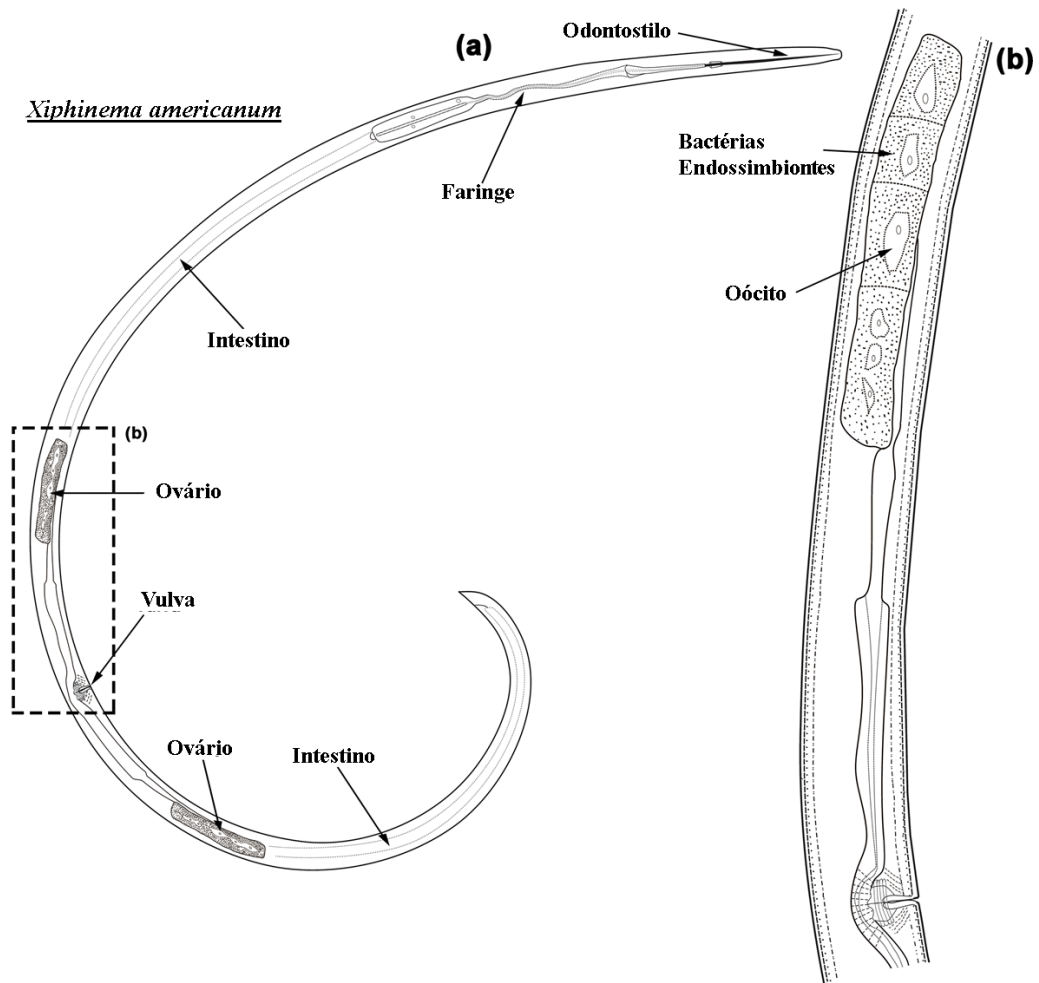


Figura 1. 2 - Morfologia geral (a) e sistema reprodutor (b) de uma espécie tipo fêmea do grupo *Xiphinema americanum* (Adaptado de Palomares-Rius *et al.*, 2016)

O comprimento de um *Xiphinema* adulto varia de 1,3 a 8,0 milímetros. O odontostilo, estilete em forma de lança usado para penetração profunda nas pontas das raízes, pode medir ao redor de 100 μm . Encontra-se conectado ao revestimento do queilóstomo por uma membrana dobrada chamada “anel guia”, estando esta presa a um odontóforo, como ilustrado na figura 1.3 (Cobb, 1913).

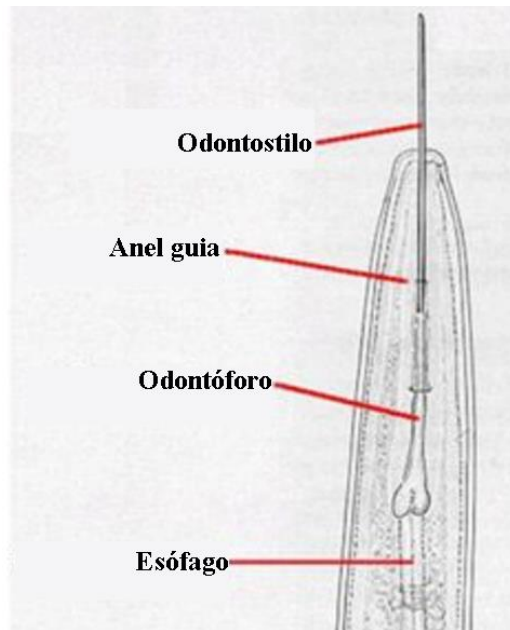


Figura 1.3 - Representação da região anterior do corpo de um nemátode-adaga (*Xiphinema* spp.) (Adaptado de Universidade da Califórnia, 2021)

Do ponto de vista prático, continua a ser um grande desafio controlar doenças virais em culturas suscetíveis, em parte devido à falta de variedade de culturas resistentes que deveriam reduzir as populações dos vetores de vírus do género *Xiphinema*. No entanto, estudos demonstraram que algumas medidas de controlo, como a biofumigação e a rotação de culturas, conseguem alcançar uma redução da população de vetores de vírus, nemátodes-adaga, podendo ser eficazes até certo ponto (Heve *et al.*, 2018).

Os nemátodes-adaga apresentam seis estágios de ciclo de vida (figura 1.4). A partenogénese é uma forma de reprodução que não requer machos e é comum em muitas espécies, mas não em todas. As fêmeas põem os ovos no solo, as larvas eclodem dos ovos e experienciam quatro fases, aumentando de tamanho a cada fase até se tornarem adultos. À medida que as larvas capazes de serem vetores se alimentam de plantas e amadurecem até se tornarem adultos (Heve *et al.*, 2018).

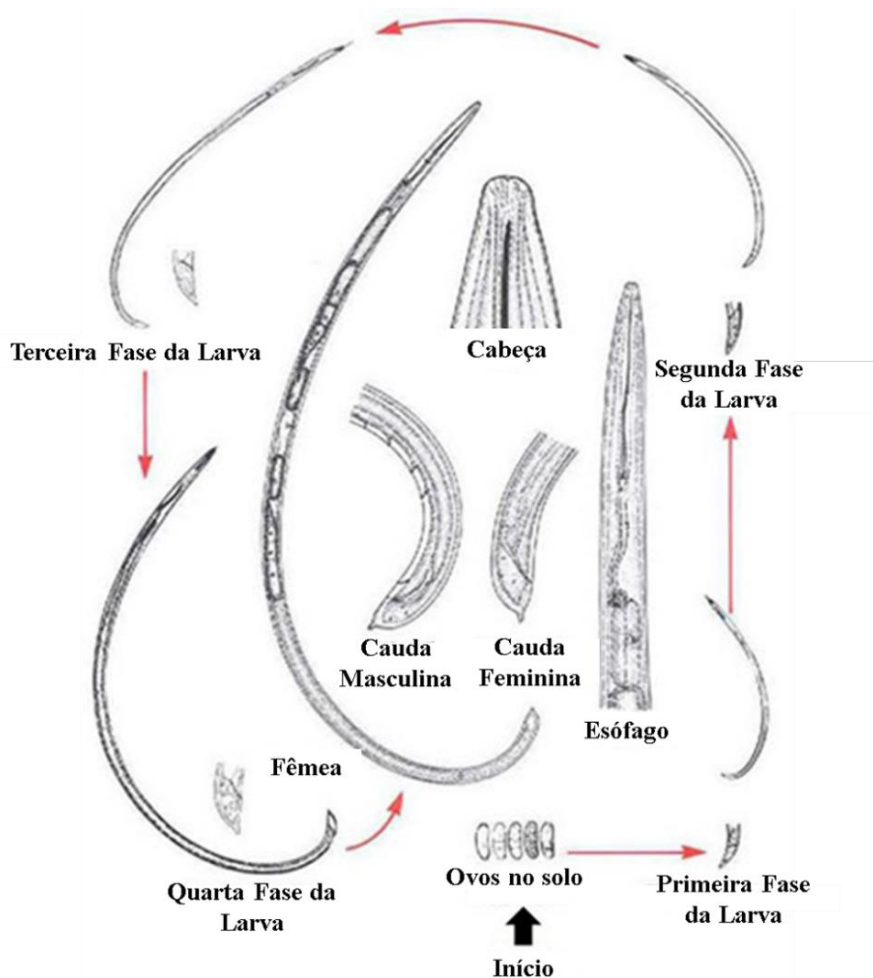


Figura 1. 4 - Esquema do ciclo de vida de um nemátode-adaga (*Xiphinema* spp.) (Adaptado de Universidade da Califórnia, 2021)

Pode acontecer, serem encontrados níveis semelhantes de variação morfológica entre a mesma espécie (variação intraespecífica) ou entre duas espécies diferentes. Por exemplo, dentro de uma espécie de *Xiphinema*, pode haver diferenças no tamanho, forma ou cor entre diferentes indivíduos. Da mesma forma, que pode haver diferenças semelhantes na morfologia entre duas espécies diferentes de *Xiphinema*. E é para isso que servem as chaves taxonômicas, que são usadas para identificar e classificar organismos com base nas suas características morfológicas. Contudo, a identificação tradicional é difícil, mesmo para especialistas, logo torna-se necessário recorrer ao uso de ferramentas moleculares tais como, *DNA barcoding* que é um método taxonômico que utiliza um pequeno marcador genético no DNA de um organismo para identificar ao nível da espécie, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) que permite

analisar as variações nos padrões de fragmentos de DNA produzidos pela digestão com enzimas de restrição. As diferenças nos comprimentos destes fragmentos refletem a variabilidade genética entre indivíduos ou espécies.

Consegue-se combinar assim técnicas moleculares com medições de morfologia e morfometria, desempenhando assim um papel crucial na área da taxonomia e na compreensão da diversidade biológica (Gutiérrez-Gutiérrez *et al.*, 2013) fornecendo métodos precisos, reprodutíveis e de alto rendimento para identificar e classificar os organismos. Estas ferramentas não só complementam os métodos morfológicos tradicionais, como também ultrapassam as suas limitações, oferecendo conhecimentos mais profundos sobre as relações genéticas e evolutivas entre as espécies.

1.2. Bactérias endossimbiontes em *Xiphinema* spp.

A endossimbiose é o termo usado quando um organismo (simbionte) vive dentro do corpo de outro organismo, esta definição engloba uma vasta gama de interações, desde o mutualismo (benéfico), até ao comensalismo (neutro) e ao parasitismo (prejudicial) (Palomares-Rius *et al.*, 2016). A endossimbiose entre invertebrados e bactérias é generalizada em numerosos artrópodes, incluindo insetos, crustáceos, aranhas e ácaros (Lo *et al.*, 2007). Os endossimbiontes desempenham um papel crucial em muitos ecossistemas por várias razões. Os endossimbiontes primários podem fornecer capacidades biossintéticas para ajudar a complementar nutrientes que são limitantes para os seus hospedeiros. Outros endossimbiontes, endossimbiontes secundários, podem fornecer compostos de defesa para ajudar a proteger os seus hospedeiros de predadores ou agentes patogénicos (Brown, 2018).

O estudo das bactérias endossimbiontes dos nemátodes parasitas de plantas tem sido intensificado nos últimos anos, tendo sido descobertas várias bactérias endossimbiontes, de diferentes grupos, a espécie “*Candidatus Xiphinematobacter*” e “*Candidatus Xiphinematocola pachtaicus*”, espécies pertencentes aos nemátodes-adaga (Palomares-Rius *et al.*, 2021). Uma vez que os “*Xiphinematobacter*” e “*Xiphinematocola pachtaicus*” são endossimbiontes e nunca foram isolados em cultura pura, o género permanece com o estatuto de *Candidatus*. Foi detetada *Verrucomicrobia* nos nemátodes-adaga da espécie do grupo *X. americanum*, e foi detetada também Bacteroidetes em algumas populações de espécies de nemátodes quistos, como *Heterodera glycines*

Ichinohe 1952 e *Globodera rostochiensis* Behrens 1975. No entanto, o papel destes endossimbiontes na biologia e sobrevivência destas espécies de nemátodes é em grande parte desconhecido.

Recentemente, o genoma do “*Candidatus Xiphinematobacter americanum*” foi sequenciado (Palomares-Rius *et al.*, 2016). O gênero "*Candidatus Xiphinematobacter*" foi proposto para incorporar três espécies de *Verrucomicrobia* que são endossimbiontes obrigatórios de nemátodes do gênero *Xiphinema*: "*Candidatus Xiphinematobacter brevicolli*", "*Candidatus Xiphinematobacter americanum*" e "*Candidatus Xiphinematobacter rivesi*". Estas bactérias residem no interior das células epiteliais das paredes ováricas do nemátode e acredita-se que influenciam o mecanismo reprodutivo do seu hospedeiro, como ilustrado na figura 1.5 (Schlesner *et al.*, 2006).

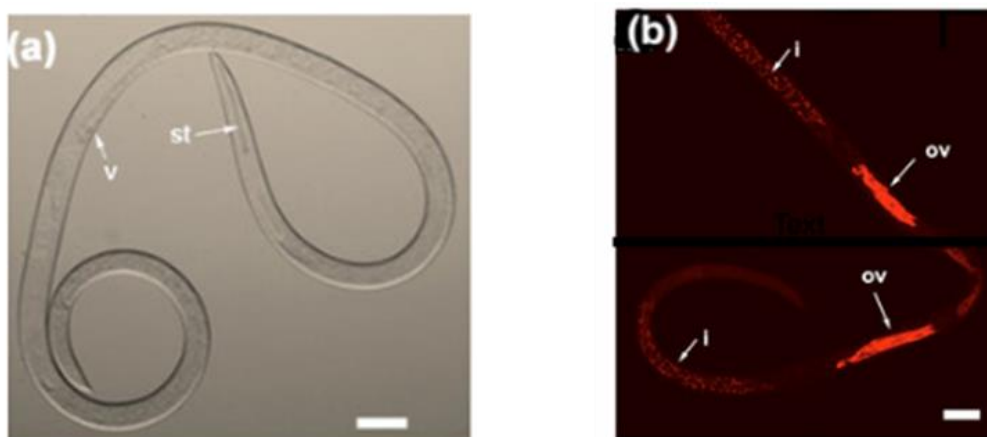


Figura 1. 5 - Detecção das bactérias endossimbiontes de *Xiphinema* spp. através da técnica FISH (*fluorescence in situ hybridization*) e microscopia confocal: a) fêmea característica do grupo *Xiphinema americanum* (v, vulva; st, estilete); e b) localização das bactérias nos ovários e nos intestinos (i, intestinos; ov, ovários) (Adaptado de Palomares-Rius *et al.*, 2021)

1.3. Caracterização molecular e filogenia de *Xiphinema* spp. e as suas bactérias endossimbiontes

O grupo *X. americanum*, composto por cerca de sessenta espécies, é o grupo mais difícil de diagnosticar entre os grupos de espécies de *Xiphinema*, devido a terem uma morfologia muito conservadora e os caracteres morfométricos se sobreporem frequentemente (Gutiérrez-Gutiérrez *et al.*, 2012). Os genes 28S rRNA e COI mtRNA

são frequentemente usados em estudos de filogenia molecular para identificar espécies e estudar a sua evolução. No caso do género *Xiphinema*, esses genes têm sido usados para esclarecer as relações filogenéticas entre as várias espécies (Sharma *et al.*, 2019). A análise do DNA mitocondrial tem provado ser uma ferramenta útil para avaliar padrões filogenéticos intraespecíficos em nemátodes fitoparasitas. O gene mitocondrial que codifica a proteína, citocromo c oxidase subunidade I (COI), tem sido aplicado em genética de populações em diversos invertebrados, como na filogenia de nemátodes fitoparasitas (Gutiérrez-Gutiérrez *et al.*, 2011). Em contraste, genes nucleares, como os segmentos de expansão D2-D3 do 28S rRNA, têm uma baixa taxa de mutação e têm sido usados com sucesso para o diagnóstico de espécies e a resolução de relações filogenéticas entre espécies de nemátodes intimamente relacionadas (Gutiérrez-Gutiérrez *et al.*, 2011). Neste sentido, a combinação destes dois marcadores é uma ferramenta poderosa para a identificação de espécies e para o estudo da evolução do *Xiphinema* spp. através da filogenia molecular (figura 1.6). No entanto, é importante lembrar que a precisão destes estudos depende da qualidade da sequenciação do DNA, da disponibilidade de sequências de referência confiáveis em bancos de dados públicos e da análise dos dados. A análise de dados é crucial em estudos de filogenia molecular por várias razões: permite a identificação correta das espécies, a interpretação dos resultados, a deteção de erros e a comparação com sequências de referência (Wiens, 2004). O gene 16S rRNA tem sido amplamente utilizado na identificação de bactérias endossimbiontes e no estudo das suas relações evolutivas pois é altamente conservado, o que significa que é muito semelhante em todas as bactérias da mesma espécie (Weisburg *et al.*, 1991). As sequências do gene 16S rRNA são utilizadas para a construção de árvores filogenéticas, o que permite investigar as relações evolutivas entre diferentes grupos de bactérias e compreender a diversificação ao longo do tempo.

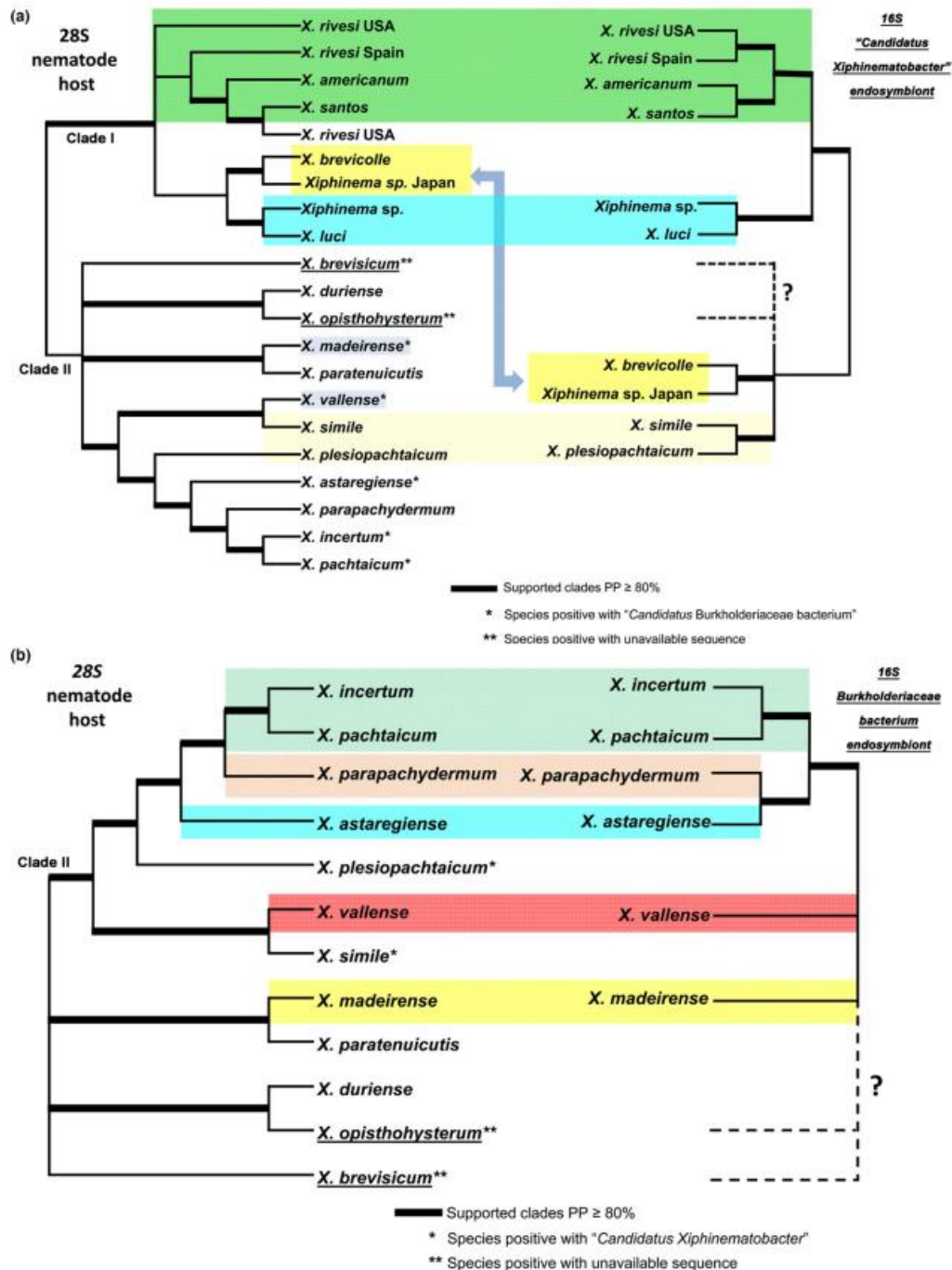


Figura 1. 6 - Cofilogenia de espécies de nemátodos (árvore de nemátodos 28S) hospedeiros e estirpes de bactérias simbiotes (endossimbiotes 16S): (a) "Candidatus Xiphinematobacter" e (b) coevolução do género de endossimbiotes da família Burkholderiaceae. (Palomares-Rius et al., 2021).

2. Metodologia

2.1. Estratégia

Local de realização: Laboratório de Nematologia sediado no Pólo da Mitra, Universidade de Évora.

Duração: 1 semestre letivo.

Ensaios

- Caracterização molecular e identificação taxonómica de espécies do género *Xiphinema*;
- Caracterização molecular das bactérias endossimbiontes associadas às diferentes espécies de *Xiphinema*;
- Análise filogenética das espécies de *Xiphinema* e das respetivas bactérias endossimbiontes.

Parâmetros analisados

- Quantificação da concentração de DNA total;
- Amplificação do gene em estudo no DNA genómico (gDNA);
- Amplificação, por PCR, dos genes de interesse a partir de DNA genómico (gDNA);
- Percentagem de identidade, *e-value* e *coverage* das sequências obtidas comparativamente com sequências na base de dados NCBI;
- Análise das relações filogenéticas dos genes em estudo.

Técnicas utilizadas

- Identificação morfológica do nemátode;
- Extração do gDNA de nemátode e bactéria;
- Quantificação de gDNA por espectrofotometria;
- Amplificação de genes por PCR;
- Eletroforese em gel de agarose;

- Purificação dos produtos de PCR;
- Preparação de sequências para sequenciação *Sanger* das regiões 16S rRNA, 28S rRNA e COI, por parte da empresa Stabvida (Costa da Caparica, Portugal).
- Análise bioinformática de sequências nucleotídicas;
- Construção de árvores filogenéticas.

2.2. Procedimento Experimental

2.2.1. Extração do DNA

Para a extração de gDNA, é necessário, em primeiro lugar, provocar a lise celular. Neste trabalho, foram utilizados dois métodos, nomeadamente, o protocolo de extração de DNA de nemátodes filiformes (Ali *et al.*, 2024) e o kit de extração de DNA (NZY Tissue gDNA Isolation kit, Nzytech). Estes métodos diferem bastante um do outro pois o primeiro método é um método mais barato e rápido, porém obtêm-se um lisado celular sem purificação do DNA, enquanto o segundo método é dependente da utilização de um kit comercial, e portanto, mais caro, porém bastante mais fidedigno pois iremos obter o DNA purificado sem a presença de outros conteúdos celulares do nemátode.

2.2.1.1. Extração do DNA de nemátodes filiformes

O único nemátode foi pescado e armazenado a -20 °C num eppendorf (0,5 mL) com aproximadamente 20 µL de dH₂O esterilizada. Deixou-se descongelar, retirou-se o nemátode do eppendorf e depositou-se num poço com dH₂O. Preparou-se uma mistura contendo 8 µL de buffer eco (6 µL de PCR buffer + 2 µL de Mg²⁺) e 12 µL de ddH₂O (água de qualidade para PCR, livre de nucleases). Depositou-se uma gota da mistura sobre uma lâmina estéril e adicionou-se o nemátode nessa mesma gota, e posteriormente cortou-se o nemátode com um bisturi em pelo menos 4 pedaços (se possível mais). Recolheu-se os pedaços do nemátode com uma micropipeta e verteu-se o conteúdo sobre o eppendorf contendo 20 µL da mistura, mantendo-se sempre o eppendorf no frio. Adicionou-se 2 µL de proteinase K (600 µg/mL) e colocou-se os tubos durante 15 min a -80 °C. Colocou-se os tubos bem fechados à temperatura de 65 °C durante 1 hora e durante 15 min a 95 °C usando um termociclador. Centrifugou-se durante alguns segundos e congelou-se até ao seu uso para PCR.

2.2.1.2. Extração do DNA pelo kit de extração de DNA “NZY Tissue gDNA Isolation kit”

Este método de extração foi apenas efetuado para efeitos de obtenção de DNA para o controlo bacteriano. Começou-se por recolher uma pequena amostra de um isolado com uma ansa de inoculação descartável e colocou-se num microtubo de 1,5 mL. Pipetou-se para dentro do tubo 180 µL de Buffer NT1 (reagente do kit) para provocar a lise celular e 20 µL de uma solução de proteinase K (reagente do kit) para ajudar na degradação de proteínas e na inativação de nucleases, homogeneizou-se durante uns segundos no vórtex, e incubou-se a 56 °C com agitação, durante 2 h. Posteriormente adicionou-se 200 µL de Buffer NL (reagente do kit) e homogeneizou-se durante 10 s no vórtex. Seguidamente adicionou-se 210 µL de etanol a 96-100 % (v/v) a cada uma das amostras e homogeneizou-se imediatamente no vórtex. Transferiu-se cada uma das amostras para uma coluna “NZYSpin Tissue Column” inserida num tubo de coleta de 2 mL e centrifugou-se durante 1 min à velocidade máxima (15000 rpm), descartou-se o sobrenadante e colocou-se a coluna num novo tubo de coleta. Adicionou-se 500 µL de Buffer NW1 (reagente do kit) à coluna e centrifugou-se durante 1 min à velocidade máxima, descartou-se posteriormente o sobrenadante e colocou-se a coluna de volta no tubo de coleta. Adicionou-se 600 µL de Buffer NW2 (reagente do kit) à coluna e centrifugou-se durante 1 min à velocidade máxima, no final descartou-se o sobrenadante e colocou-se mais uma vez a coluna de volta no tubo de coleta. Para secar a membrana da coluna, procedeu-se a uma centrifugação de 2 min à velocidade máxima. Para eluir o DNA colocou-se a coluna dentro de um microtubo de 1,5 mL e adicionou-se 50 µL de Buffer NE (reagente do kit) diretamente na membrana da coluna, incubou-se durante 1 min à temperatura da sala e de seguida centrifugou-se 2 min à velocidade máxima. Guardou-se o gDNA a 4 °C até à sua utilização.

2.2.2. Amplificação dos genes de interesse por PCR

Procedeu-se à amplificação pela técnica de PCR dos genes 28S rRNA, 16S rRNA e COI mtRNA. Para isso, prepararam-se as seguintes reações (*master mix*) de PCR com os seguintes reagentes (obtendo-se sempre um volume final de 50 µL; de acordo com as tabelas 2.1, 2.2 e 2.3):

Tabela 2. 1 - Composição da reação para amplificação por PCR do gene 28S rRNA

| Reagentes | Volume (µL) |
|---------------------------------------|-------------|
| Supreme NZYTaq II Green Master Mix | 25 |
| H ₂ O | 21 |
| Primer F - 391F (10mM) | 1 |
| Primer R – D3B (10mM) | 1 |
| DNA | 2 |

Tabela 2. 2 - Composição da reação para amplificação por PCR do gene 16S rRNA

| Reagentes | Volume (µL) |
|---------------------------------------|-------------|
| Supreme NZYTaq II Green Master Mix | 25 |
| H ₂ O | 21 |
| Primer F – 27F (10mM) | 1,25 |
| Primer R – 1492R (10mM) | 1,25 |
| DNA | 1,5 |

Tabela 2. 3 - Composição da reação para amplificação por PCR do gene COI mtRNA

| Reagentes | Volume (µL) |
|---------------------------------------|-------------|
| Supreme NZYTaq II Green Master Mix | 25 |
| H ₂ O | 20,5 |
| Primer F - COIF – XH (10mM) | 1,25 |
| Primer R – COIR - XH (10mM) | 1,25 |
| DNA | 2 |

Preparou-se sempre um controlo negativo (com todos os reagentes da reação de PCR exceto o DNA, no lugar do DNA adicionou-se H₂O), para ver se ocorreu contaminação, e no caso do gene 16S rRNA preparou-se também um controlo positivo (com todos os reagentes da reação de PCR, porém, com o DNA obtido do kit de extração de DNA “NZY Tissue gDNA Isolation kit”).

Tabela 2. 4 - Informação sobre os *primers* usados no PCR

| Primer ^a | Sequência ^b | Região de amplificação | Referência |
|---------------------|---------------------------|------------------------|-------------------------------|
| 391F | AGCGGAGGAAAAGAAACT | 28S | (De Ley <i>et al.</i> , 1999) |
| D3BR | TCGGAAGGAACCAGCTACTA | 28S | (Nunn, 1992) |
| 27F | AGAGTTTGATCMTGGCTCAG | 16S | (Galkiewicz e Kellogg, 2008) |
| 1492R | GGTTACCTTGTTACGACTT | 16S | (Galkiewicz e Kellogg, 2008) |
| COIF-XH | GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG | COI | (Gu <i>et al.</i> , 2014) |
| COIR-XH | TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATC | COI | (Gu <i>et al.</i> , 2014) |

a* F, forward; R, reverse

b* Os *primers* são indicados na orientação 5'-3'.

2.2.3. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR amplificados foram analisados pela técnica de eletroforese em gel de agarose. Para isso, preparou-se um gel de agarose 1 % (w/v) para cada um dos genes a analisar (28S rRNA, 16S rRNA e COI mtRNA), com 50 mL de TBE 0,5X e 0,6 g de agarose. A solução foi aquecida no micro-ondas (com o cuidado de não deixar ferver) até a agarose se dissolver na solução-tampão. Posteriormente, adicionou-se 0,5 µL do agente intercalante *GreenSafe* (NZYTech, Lisbon, Portugal) e procedeu-se à homogeneização da solução. A mistura foi vertida num berço, sendo colocado um pente com poços (esse pente permite formar os poços para as amostras). Deixou-se repousar durante aproximadamente 1 h (para ter a certeza que estava totalmente solidificado). Colocou-se o berço com o gel na tina horizontal de eletroforese ligada a uma fonte de energia. Pipetou-se 4 µL de amostras para cada poço (deixar um poço de intervalo entre os genes com DNA e os controlos, para evitar contaminação) e em último pipetou-se 2 µL de marcador molecular de tamanho 1 Kbp no primeiro poço. Fechou-se a tina e programou-se a corrida da eletroforese durante 40 min a uma voltagem de 80/85 V. Após a conclusão da eletroforese, fez-se a revelação da imagem, colocando-se o gel no transiluminador de luz UV para observação das bandas de eletroforese. No final fotografou-se o gel com uma câmara fotográfica.

2.2.4. Purificação dos produtos de PCR e sequenciação

Para purificação dos produtos de PCR utilizou-se o kit *NZY Gelpure*, seguindo o procedimento indicado no respetivo kit. Começou-se por transferir o volume da mistura de reação para um tubo de microcentrifugação de 1,5 mL e de seguida adicionou-se cinco volumes de Buffer de ligação. Misturou-se invertendo o tubo algumas vezes e centrifugou-se brevemente à velocidade máxima (15000 rpm) para recolher a amostra. Adicionou-se a mistura acima à coluna de centrifugação NZYTech, de seguida centrifugou-se 1 min à velocidade máxima e descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 600 µL de Buffer de lavagem, centrifugou-se por 1 min à velocidade máxima e descartou-se o sobrenadante no tubo de coleta. Para secar a membrana da coluna centrifugou-se 1 min à velocidade máxima e descartou-se o sobrenadante. Colocou-se a coluna de centrifugação NZYTech num tubo de microcentrifugação limpo de 1,5 mL e adicionou-se 25 µL de água ultrapura ao centro da coluna, deixando incubar à temperatura ambiente durante 1 min. De seguida centrifugou-se por 1 min à velocidade máxima para eluir o DNA. Adicionou-se mais uma vez, 25 µL de água ultrapura ao centro da coluna, deixando incubar à temperatura ambiente durante 1 min. No final centrifugou-se durante 1 min à velocidade máxima para eluir o DNA e armazenou-se o DNA purificado a -20 °C. Para cada produto de PCR, prepararam-se dois eppendorfs em separado contendo 10 µL de produto e 3 µL de *primer forward* e *reverse*. Os produtos preparados foram enviados para sequenciação na empresa Stabvida (Costa da Caparica, Portugal).

2.2.5. Análise de sequências e filogenia

Recebeu-se os cromatogramas de dois nemátodes que foram enviados para sequenciação, um *Xiphinema* do Alentejo (AL02) que continha cromatogramas 16S e 28S e um *Xiphinema* de Lisboa (LISB5) que continha cromatogramas de 16S, 28S e COI.

Os cromatogramas foram analisados no programa BioEdit v7.7.1 (Hall, 1999). As respetivas sequências foram obtidas através da análise dos cromatogramas, selecionando apenas a região da sequência que apresentava melhor qualidade. As sequências finais foram construídas a partir da junção da sequência *forward* e com o seu complemento, após se ter feito “*reverse complement*”, seguido de “*CAP contig*”. Posteriormente, as sequências obtidas foram comparadas com as disponíveis na base de dados NCBI GenBank utilizando o programa BLAST e adquiriu-se as cinco sequências mais próximas de cada um dos isolados. Para além das cinco sequências mais próximas obteve-se também outras sequências a partir de artigos científicos (Palomares-Rius *et al.*, 2016, 2017, Lazarova *et al.*, 2016). Utilizou-se de novo o programa BioEdit e procedeu-se ao alinhamento múltiplo ClustalW de todas as sequências. De seguida cortou-se as extremidades de todas as sequências de modo a ficarem com o mesmo tamanho e guardou-se num ficheiro fasta (.fasta). Exportou-se o ficheiro para o programa MEGA v11.0.13 (Tamura *et al.*, 2021) e procedeu-se de novo ao alinhamento ClustalW de todas as sequências, guardando-se agora o ficheiro em mega (.mas). Procedeu-se à determinação do melhor modelo de árvore filogenética (Models→Find best DNA/Protein Models) e de seguida procedeu-se então à construção da árvore filogenética utilizando-se o método de Neighbor-joining com o modelo obtido anteriormente (o modelo variou entre o 16S, 28S e COI). Para obter a melhor árvore possível e mais fidedigna procedeu-se depois à construção da árvore filogenética utilizando-se o método de Maximum Likelihood, com o melhor modelo e com 1000 *bootstraps* (os valores de *bootstrap* numa árvore filogenética indicam quantas vezes, o mesmo ramo é observado ao repetir a geração de uma árvore filogenética num conjunto de dados reamostrado). Depois de construir a árvore, guardou-se essa mesma num ficheiro newick (.nwk) e exportou-se a árvore para o programa CLC Sequence Viewer 8 (QIAGEN, 2017) onde se procedeu à formatação e edição de todas as árvores filogenéticas.

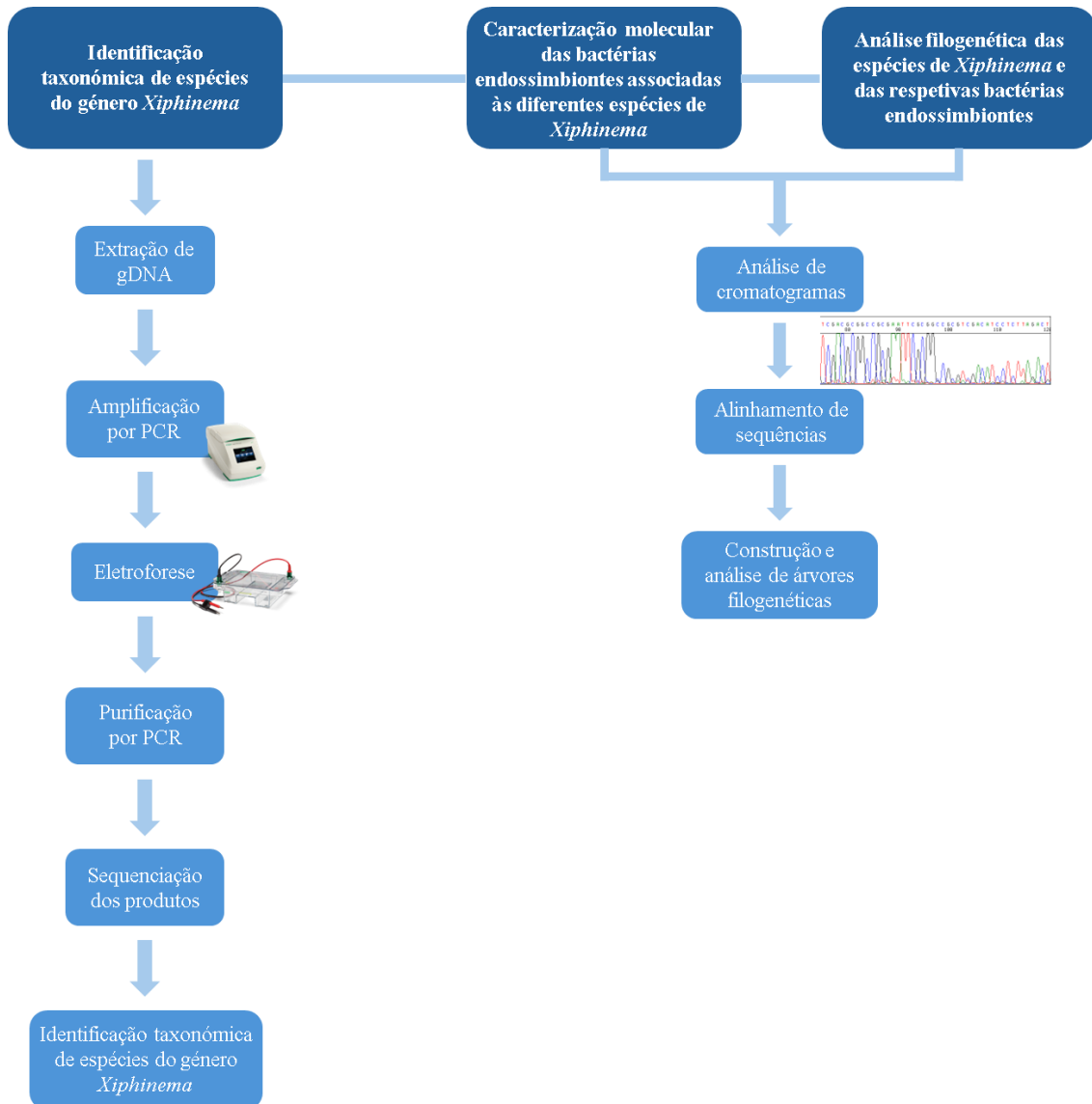
2.3. Equipamento

- Balança digital, Ohaus Pioneer
- Câmara de fluxo vertical, Sterilgard SG403A-HE
- Centrífuga, Hitachi HIMAC CT15E
- Centrífuga, Scanspeed modelo mini
- Fonte de alimentação, Power Source VWR 300V
- Microscópio Estéreo, Olympus SZX12
- Máquina fotográfica, Canon Power Shot G10
- Micro-ondas, SchaubLorenz MW20-2223
- Termociclador, BIO-RAD T100 Thermal Cycler
- Tina 300mL, Cleaver multiSUB Midi
- Tina 100mL, RAD Biorad-wide mini sub cell GT
- Transiluminador, VWR Geno view
- Vórtex, VWR International 444-1372

2.4. Reagentes

- Agarose (NYZtech)
- Buffer Eco (PCR buffer + Mg²⁺)
- GreenSafe Premium (NYZtech)
- Marcador 1kb (BIORON)
- NZY Gelpure kit
- NZY Tissue gDNA isolation kit
- Primer 391F
- Primer D3B
- Primer 27F
- Primer 1492R
- Primer COIF – XH
- Primer COIR – XH
- Proteinase K
- Supreme NZYTaq II Green Master Mix
- TBE Buffer 0,5X

2.5. Diagrama do Trabalho



3. Resultados e Discussão

3.1. Identificação taxonómica dos nemátodes em estudo e dos respetivos endossimbiontes

3.1.1. Amplificação do gene 16S rRNA dos endossimbiontes em estudo

As amostras de gDNA dos dois endossimbiontes e do controlo positivo *Agrobacterium tumefaciens* GV131 foram amplificadas com os *primers* 27F-1492R do gene 16S rRNA, cujo tamanho ronda os 1,5 kb (Galkiewicz e Kellogg, 2008). Utilizou-se o gene 16S rRNA para a identificação taxonómica, uma vez que é um gene altamente conservado, permitindo a diferenciação entre diferentes espécies bacterianas. No entanto, também possui regiões hipervariáveis, que permitem distinguir espécies específicas. A análise do 16S rRNA também permite construir árvores filogenéticas, mostrando as relações evolutivas entre diferentes bactérias, ajudando assim a entender como as espécies estão relacionadas e a classificá-las em grupos taxonómicos (Mizrahi-Man *et al.*, 2013).

Ao observar a figura 3.1 pode-se confirmar que as amostras obtidas tiveram o tamanho esperado ($\approx 1,5$ kb), à semelhança do controlo positivo. O controlo negativo não apresentou amplificação.

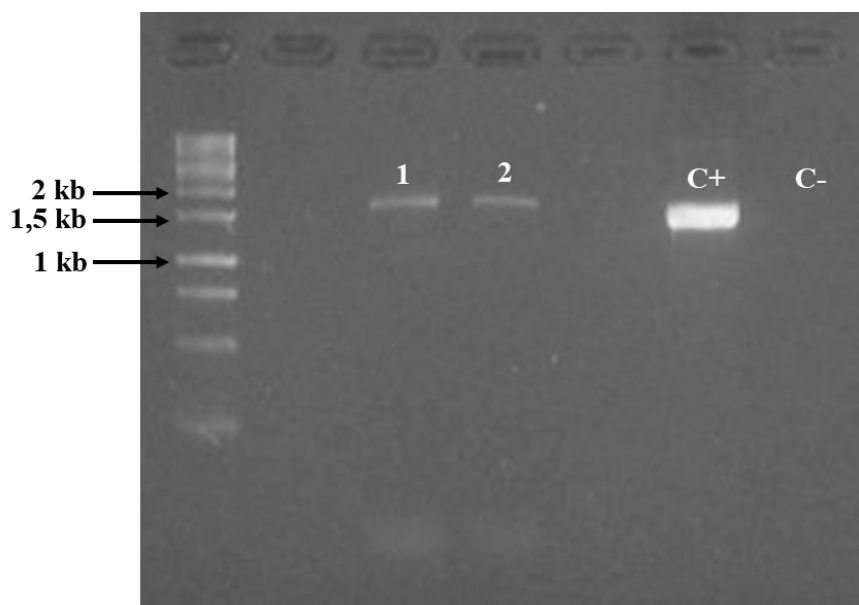


Figura 3. 1 - Amplificação do gene 16S rRNA e análise por eletroforese. As amostras representadas são: 1 e 2 – amostras de DNA (do isolado), C+ – controlo positivo (com DNA do “NZY Tissue gDNA Isolation kit”) e C- – controlo negativo (sem DNA)

3.1.2. Amplificação do gene 28S rRNA dos nemátodes em estudo

As amostras de gDNA dos dois isolados de *Xiphinema* foram amplificadas com os *primers* 391F-D3BR do gene 28S rRNA, cujo tamanho ronda os 1,2 kb.

Ao observar a figura 3.2 pode-se confirmar que as amostras obtidas tiveram o tamanho esperado (1,2 kb). Não ocorreu amplificação do controlo negativo, confirmando assim a não ocorrência de contaminação.

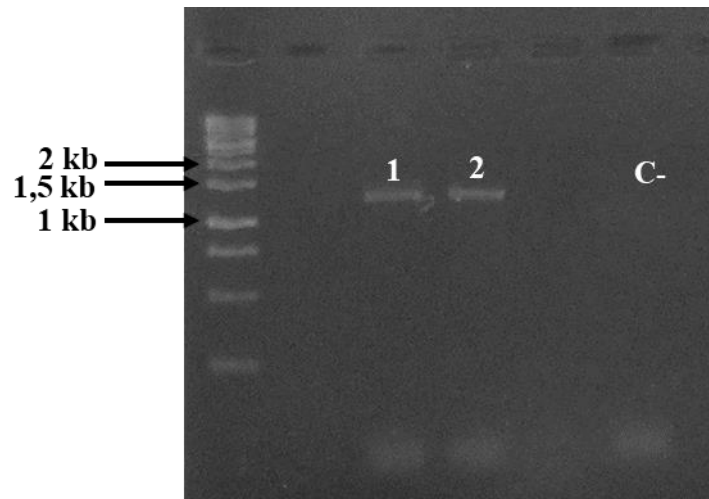


Figura 3. 2 - Amplificação do gene 28S rRNA e análise por eletroforese. As amostras representadas são: 1 e 2 – amostras de DNA (do isolado) e C- – controlo negativo (sem DNA)

3.1.3. Amplificação do gene COI mtRNA dos nemátodes em estudo

As amostras de gDNA dos dois isolados de *Xiphinema* foram amplificadas com os *primers* COIF–XH e COIR–XH do gene COI mtRNA, cujo tamanho ronda os 0,4 kb.

Ao observar a figura 3.3 pode-se confirmar que apenas a amostra 2 obteve o tamanho esperado (0,4 kb). A amostra 1 obteve fraca amplificação, possivelmente devida a baixa concentração do DNA extraído. Não ocorreu amplificação do controlo negativo, confirmando assim que muito possivelmente não ocorreu nenhuma contaminação.

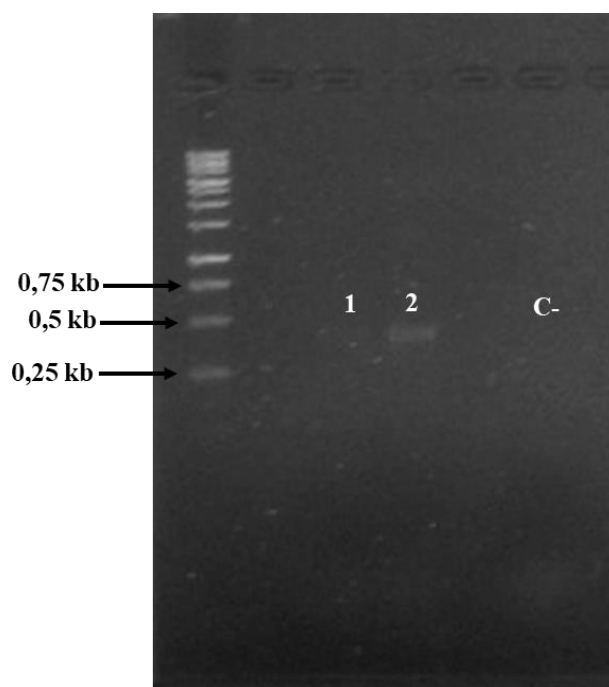


Figura 3.3 - Amplificação do gene COI mtRNA e análise por eletroforese. As amostras representadas são: 1 e 2 – amostras de DNA (do isolado) e C- – controlo negativo (sem DNA)

Os produtos de PCR obtidos (16S e 28S) foram purificados e confirmados através de eletroforese em gel de agarose (figura 3.4). Ao observar a figura 3.4 pode-se concluir que todas as amostras foram purificadas com sucesso e que se obteve o tamanho esperado. Mais uma vez, não ocorreu amplificação do controlo negativo, confirmando assim que muito possivelmente não ocorreu nenhuma contaminação.

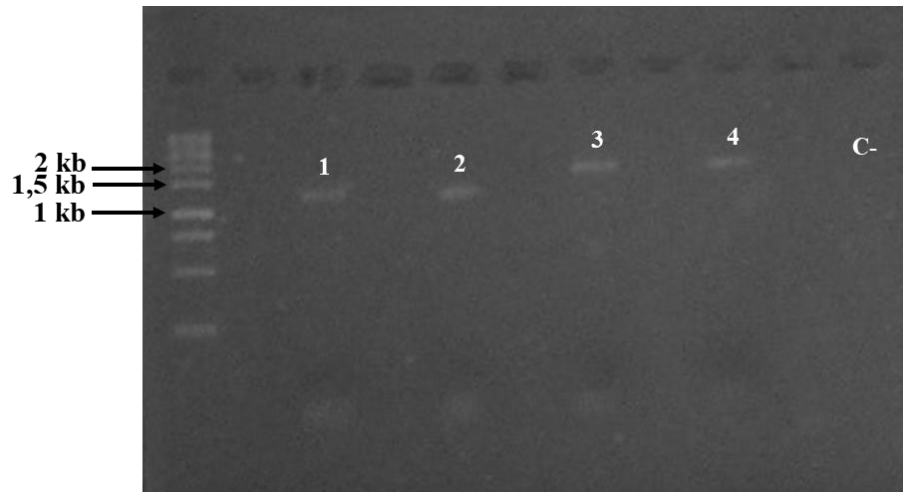


Figura 3. 4 - Purificação dos genes 28S rRNA e 16S rRNA e análise por eletroforese. As amostras representadas são: 1 e 2 – amostras de DNA (do gene 28S), 3 e 4 – amostras de DNA (do gene 16S) e C- – controlo negativo (sem DNA)

3.2. Análise das sequências e filogenia

3.2.1. Análise da sequência e filogenia do *Xiphinema* do Alentejo (AL02)

As sequências de 16S e 28S obtidas foram comparadas com as disponíveis na base de dados NCBI GenBank utilizando o programa BLASTn, para identificação taxonômica (tabela 3.1). As sequências mais próximas foram consideradas para a análise filogenética, juntamente com outras obtidas de Palomares-Rius *et al.*, 2016.

Tabela 3. 1 - Identificação taxonômica do *Xiphinema* sp. AL02 e do respetivo endossimbionte, utilizando os marcadores moleculares 16S rRNA e 28S rRNA

| | | Descrição | Query Cover (%) | E-value | Identidade (%) | NCBI Accession |
|----------------|----------|---|-----------------|---------|----------------|----------------|
| Endossimbionte | 16S rRNA | <i>Candidatus</i> Xiphinematincola pachtaicus IAS | 100 | 0.0 | 97.92 | KT735068.1 |
| | | Burkholderiaceae bacterium W44 | 100 | 0.0 | 97.92 | KU899555.1 |
| | | Burkholderiaceae bacterium GRA18 | 100 | 0.0 | 97.78 | KT735077.1 |
| | | Burkholderiaceae bacterium K79 | 100 | 0.0 | 97.70 | KU899558.1 |
| | | Burkholderiaceae bacterium HOUD | 99 | 0.0 | 97.83 | KT735076.1 |
| | | Burkholderiaceae bacterium 263 | 99 | 0.0 | 98.92 | KU899550.1 |
| | | Burkholderiaceae bacterium IAS_3 | 90 | 0.0 | 98.97 | KT735071.1 |
| | | Burkholderiaceae bacterium OLE8 | 88 | 0.0 | 99.37 | KT735078.1 |
| | | Burkholderiaceae bacterium FRIG | 88 | 0.0 | 99.37 | KT735074.1 |
| | | Burkholderiaceae bacterium IAS_5 | 88 | 0.0 | 99.37 | KT735073.1 |
| Hospedeiro | 28S rRNA | <i>Xiphinema pachtaicum</i> isolate nem233 | 99 | 0.0 | 99.73 | HM921365.1 |
| | | <i>X. pachtaicum</i> isolate nem222 | 99 | 0.0 | 99.73 | HM921353.1 |
| | | <i>X. pachtaicum</i> isolate VIEV7 | 99 | 0.0 | 99.59 | OK356811.1 |
| | | <i>X. pachtaicum</i> isolate nem70 | 99 | 0.0 | 99.59 | HM921397.1 |
| | | <i>X. pachtaicum</i> isolate AN308 | 99 | 0.0 | 99.46 | MK957231.1 |
| | | <i>X. pachtaicum</i> isolate nem224 | 95 | 0.0 | 99.76 | HM921355.1 |
| | | <i>X. pachtaicum</i> isolate nem225 | 95 | 0.0 | 99.64 | HM921356.1 |
| | | <i>X. pachtaicum</i> isolate NSB5 | 94 | 0.0 | 99.76 | KU250155.1 |
| | | <i>X. pachtaicum</i> isolate AN599 | 92 | 0.0 | 99.75 | MN046399.1 |

Relativamente à identificação do endossimbionte através do gene 16S rRNA, a sequência mais próxima foi do *Candidatus Xiphinematocola pachtaicus* IAS, tendo o resto das sequências entre 88-100 % de *query cover*, 97.70-99.37 % de *percent identity* e 0.0 de *e-value*, o que significa que grande parte da sequência estudada está incluída nas correspondências obtidas no BLAST e que essas correspondências são idênticas. Já no caso do 28S, a sequência mais próxima foi do *Xiphinema pachtaicum* isolate nem233, tendo o resto das sequências entre 92-99 % de *query cover*, 99.46-99.76 % de *percent identity* e 0.0 de *e-value*, o que se significa outra vez que grande parte da sequência estudada está incluída nas correspondências obtidas no BLAST e que essas correspondências são idênticas.

As árvores filogenéticas encontram-se representadas na figura 3.5 e foram construídas a partir das sequências presentes na tabela 3.1 e a partir das sequências obtidas no artigo indicado anteriormente (Palomares-Rius *et al.*, 2016). As árvores filogenéticas fornecidas representam a análise de relações evolutivas entre diferentes organismos baseadas em sequências genéticas específicas. Ao analisar a árvore da esquerda (28S), referente ao hospedeiro *Xiphinema* sp. AL02, verifica-se a formação de diversos clados, que representam agrupamentos de diferentes isolados de *Xiphinema*. Obteve-se um ótimo suporte de *bootstrap*, sugerindo assim confiança nas ramificações. Ao analisar a árvore da direita (16S), referente ao endossimbionte, consegue-se observar também diversos clados, que representam diferentes isolados de Burkholderiaceae associados a diferentes isolados de *Xiphinema*. Utilizou-se a espécie *Terrimicrobium sacchariphilum* strain NM-5 (GU129926.1) como *outgroup*, pois permite-nos obter uma árvore filogenética mais robusta e mais precisa tal como estimar a raiz da árvore filogenética. Não se obteve um valor igualmente bom de *bootstrap*, porém obteve-se na mesma clados com elevadas percentagens de *bootstraps*, sugerindo assim à mesma uma elevada confiança nas ramificações. A comparação das duas árvores pode revelar correlações entre os hospedeiros *Xiphinema* e os seus endossimbiontes bacterianos da família Burkholderiaceae. Por exemplo, um clado específico de *Xiphinema* pode estar associado a um clado específico de Burkholderiaceae, sugerindo coevolução ou associação específica entre hospedeiro e endossimbionte, como se pode observar pelas cores presentes nas imagens. Pode-se concluir que o gene 28S que foi analisado pertence a um hospedeiro *X. pachtaicum* (Tulaganov, 1938) Kirjanova, 1951, enquanto o gene 16S pertence a uma bactéria endossimbionte Burkholderiaceae.

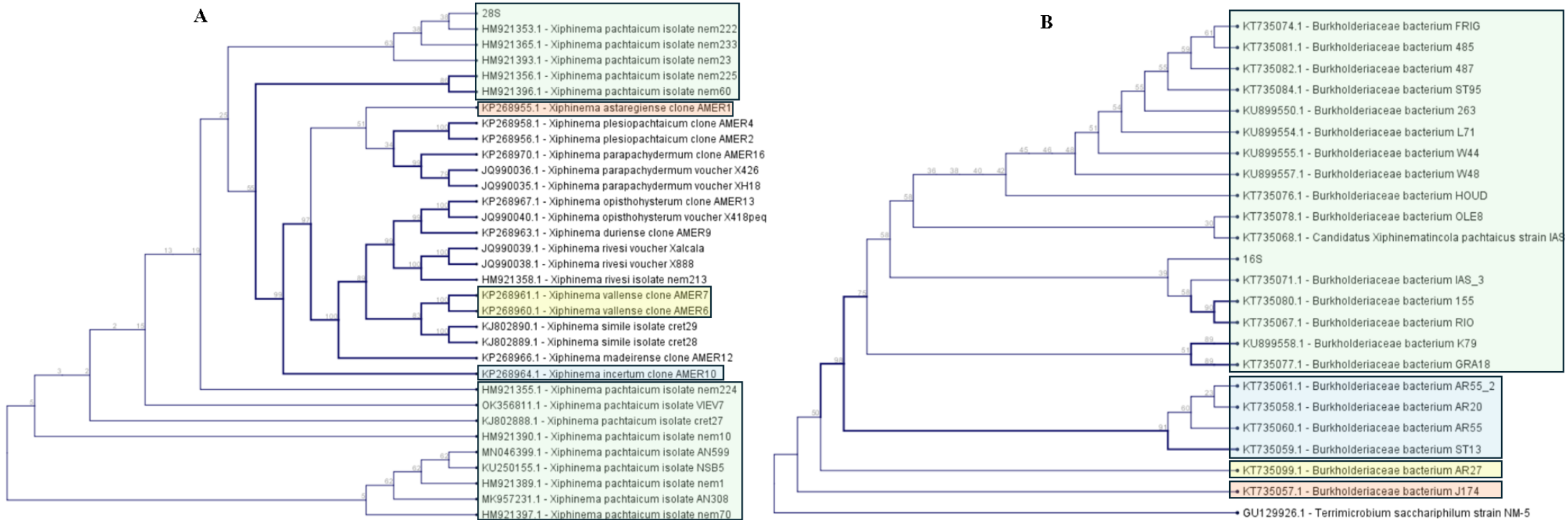


Figura 3.5 - Cofilogenia de espécies de nemátodes hospedeiros 28S (a) e respectivas bactérias endossimbiontes 16S (b) (AL02). (a) Obtida através do método estatístico *maximum likelihood* com o modelo GTR+G+I e 1000 repetições de *bootstraps*. (b) Obtida através do método estatístico *maximum likelihood* com o modelo K2+G+I e 1000 repetições de *bootstraps*. Linhas a negrito representam valores de *bootstrap* $\geq 70\%$ e as diversas cores representam a associação específica entre hospedeiro e endossimbionte

3.2.2. Análise da sequência e filogenia do *Xiphinema* de Lisboa (LISB5)

As sequências de 16S, 28S e COI obtidas mais uma vez foram comparadas com as disponíveis na base de dados NCBI GenBank utilizando o programa BLASTn, para identificação taxonómica (tabela 3.2). As sequências mais próximas foram consideradas para a análise filogenética, juntamente com outras obtidas de Palomares-Rius *et al.*, 2017 e de Lazarova *et al.*, 2016.

Tabela 3. 2 - Identificação taxonómica do *Xiphinema* sp. LISB5 e do respetivo endossimbionte, utilizando os marcadores moleculares 16S rRNA, 28S rRNA e COI mtRNA

| | | Descrição | Query Cover (%) | E-value | Identidade (%) | NCBI Accession |
|----------------|------------------------------------|---|-----------------|---------|----------------|----------------|
| Endossimbionte | 16S | Uncultured <i>Candidatus</i> Xiphinematobacter sp. clone Serbia | 99 | 0.0 | 97.80 | KJ614456.1 |
| | | Uncultured <i>Candidatus</i> Xiphinematobacter sp. clone Portugal | 99 | 0.0 | 97.73 | KJ614457.1 |
| | | Uncultured <i>Candidatus</i> Xiphinematobacter sp. clone 62 | 90 | 0.0 | 98.46 | MT568602.1 |
| | | Uncultured <i>Candidatus</i> Xiphinematobacter sp. clone Slovakia | 99 | 0.0 | 94.07 | KJ614455.1 |
| | | Uncultured <i>Candidatus</i> Xiphinematobacter sp. clone Slovakia | 98 | 0.0 | 93.68 | KJ614450.1 |
| Hospedeiro | 28S | <i>X. vallense</i> clone AMER6 | 100 | 0.0 | 98.84 | KP268960.1 |
| | | <i>X. vallense</i> clone AMER5 | 93 | 0.0 | 99.22 | KP268959.1 |
| | | <i>X. plesiopachtaicum</i> clone AMER2 | 100 | 0.0 | 85.82 | KP268956.1 |
| | | <i>X. plesiopachtaicum</i> clone AMER4 | 100 | 0.0 | 85.67 | KP268958.1 |
| | | <i>X. plesiopachtaicum</i> clone AMER3 | 100 | 0.0 | 85.69 | KP268957.1 |
| | | <i>X. persicum</i> isolate 46 | 99 | 0.0 | 87.50 | MT073110.1 |
| | | <i>X. persicum</i> isolate 62 | 99 | 0.0 | 87.38 | MT073111.1 |
| | <i>X. astaregiense</i> clone AMER1 | 97 | 0.0 | 87.45 | KP268955.1 | |
| | COI | <i>X. vallense</i> voucher H0003 | 86 | 0.0 | 99.72 | KY816653.1 |
| | | <i>X. vallense</i> voucher AR027 | 86 | 0.0 | 99.72 | KY816652.1 |

No caso do 16S, a sequência mais próxima foi do Uncultured *Candidatus* Xiphinematobacter sp. clone Serbia, tendo o resto das sequências entre 90-99 % de *query cover*; 93.68-98.46 % de *percent identity* e 0.0 de *e-value*. No caso do 28S, a sequência mais próxima foi do *X. vallense* clone AMER6, tendo o resto das sequências entre 93-100 % de *query cover*, 85.67-99.22 % de *percent identity* e 0.0 de *e-value*. E no caso do COI, as sequências mais próximas foram do *X. vallense* voucher H0003/AR027, obtendo 86 % de *query cover*, 99.72 % de *percent identity* e 0.0 de *e-value*, o que

significa que grande parte das sequências estudadas estão incluídas nas correspondências obtidas no BLAST e que essas correspondências são idênticas.

As árvores filogenéticas 28S e 16S encontram-se representadas na figura 3.6 e foram construídas a partir das sequências presentes na tabela 3.2 e a partir das sequências obtidas nos artigos indicados anteriormente (Palomares-Rius *et al.*, 2017, Lazarova *et al.*, 2016). As árvores filogenéticas fornecidas representam mais uma vez a análise de relações evolutivas entre diferentes organismos baseadas em sequências genéticas específicas. Ao analisar a árvore da esquerda (28S), referente ao hospedeiro, consegue-se observar dois clados principais e diversos subclados, que representam agrupamentos de diferentes isolados e clones de *Xiphinema*. Utilizou-se a espécie *Paralongidorus iranicus* isolate E80 (JN032587.1) como *outgroup*, porém não se verificou um bom *outgroup*, pois encontra-se no meio dos clados (no *ingroup*), logo no meio da evolução, e não de fora onde deveria estar. Obteve-se um ótimo suporte de *bootstrap* ($\geq 70\%$). Ao analisar a árvore da direita (16S), referente ao endossimbionte, consegue-se observar diversos clados, que representam diferentes isolados do endossimbionte *Candidatus Xiphinematobacter*. Utilizou-se a espécie *Verrucomicrobium spinosum* strain MT_SG_E_24_27F.27F (MN684281.1) como *outgroup*, porém mais uma vez não se verificou um bom *outgroup*, pois em vez de ter ficado isolado do resto da árvore, juntou-se à espécie Uncultured *Candidatus Xiphinematobacter* sp. clone Brazil (KJ614454.1). Obteve-se também um ótimo suporte de valores de *bootstrap*. A comparação das duas árvores pode fornecer uma visão detalhada da coevolução entre os hospedeiros *Xiphinema* e seus endossimbiontes *Candidatus Xiphinematobacter*. Porém não se obtiveram muitas correlações entre os hospedeiros e os seus endossimbiontes bacterianos (cores presentes nas imagens). Isto pode-se dever ao facto de terem sido utilizados dois artigos científicos diferentes, um para a construção da árvore 28S e outro para a construção da árvore 16S. Porém, consegue-se concluir que o gene 28S que foi analisado pertence a um hospedeiro *X. vallense* Archidona-Yuste, Navas-Cortés, Cantalapiedra-Navarrete, Palomares-Rius & Castillo, 2016, enquanto que o gene 16S analisado, pertence a um endossimbionte *Candidatus Xiphinematobacter* sp., próximo do *Candidatus Xiphinematobacter* sp. clone 62 (MT568602.1).

As árvores filogenéticas COI e 16S encontram-se representadas na figura 3.7 e foram construídas a partir das sequências presentes na tabela 3.2 e a partir das sequências obtidas nos artigos indicados anteriormente (Palomares-Rius *et al.*, 2017, Lazarova *et*

al., 2016). À semelhança das árvores analisadas anteriormente, estas árvores filogenéticas representam mais uma vez a análise de relações evolutivas entre diferentes organismos baseadas em sequências genéticas específicas. Ao analisar a árvore da esquerda (COI), referente ao hospedeiro, consegue-se observar dois clados principais e diversos subclados, que representam agrupamentos de diferentes isolados e clones de *Xiphinema*. Utilizou-se a espécie *Longidorus lignosus* voucher CD1120 (KY816683.1) como *outgroup* porém, mais uma vez, não se verificou um bom *outgroup*, pois em vez de ter ficado isolado do resto da árvore, juntou-se à espécie *Xiphinema sphaerocephalum* voucher AR063 (KY816649.1). No entanto acabou por surgir um *outgroup* inesperado, a espécie *Xiphinema conurum* voucher ST045 (KY816603.1), que permite assim construir uma árvore filogenética mais robusta e mais precisa. À semelhança das árvores anteriores, obteve-se um ótimo suporte de *bootstrap* ($\geq 70\%$). À semelhança da árvore anterior, não se obtiveram muitas correlações entre os hospedeiros e os seus endossimbiontes bacterianos (cores presentes nas imagens). Isto pode-se dever ao facto de terem sido utilizados dois artigos científicos diferentes, um para a construção da árvore COI e outro para a construção da árvore 16S. Consegue-se concluir que o gene COI que foi analisado no laboratório, pertence a um hospedeiro *X. vallense*, tal como se verificou anteriormente para o gene 28S, o que faz sentido, pois foram ambos obtidos da mesma amostra (LISB5).

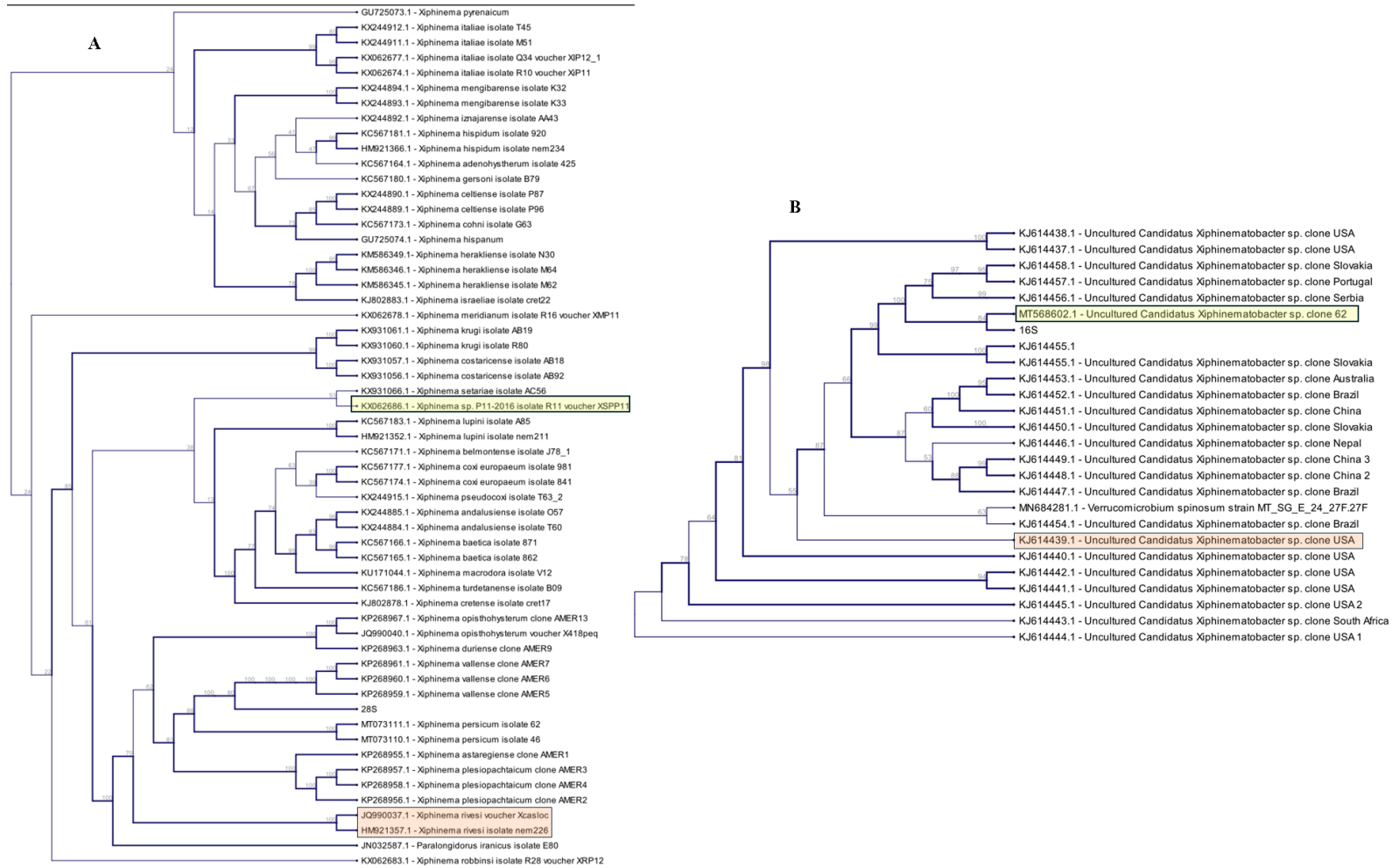


Figura 3. 6 - Cofilogenia de espécies de nemátodos hospedeiros 28S (a) e respectivas bactérias endossimbiontes 16S (b) (LISB5). (a) Obtida através do método estatístico *maximum likelihood* com o modelo GTR+G+I e 1000 repetições de *bootstraps*. (b) Obtida através do método estatístico *maximum likelihood* com o modelo K2+G+I e 1000 repetições de *bootstraps*. Linhas a negrito representam valores de *bootstrap* $\geq 70\%$ e as diversas cores representam a associação específica entre hospedeiro e endossimbionte

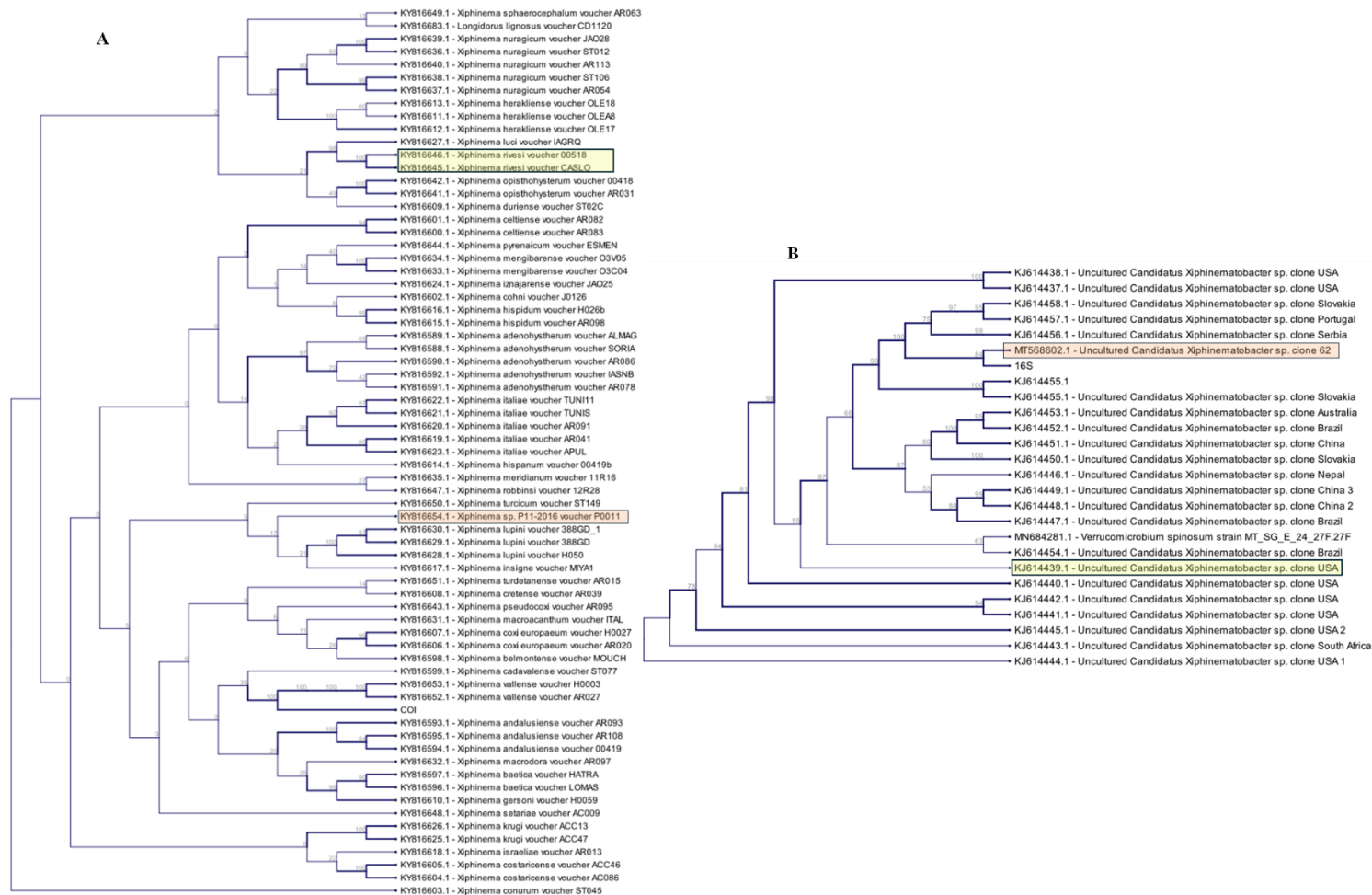


Figura 3. 7 - Cofilogenia de espécies de nemátodos hospedeiros COI (a) e respectivas bactérias endossimbiontes 16S (b) (LISB5). (a) Obtida através do método estatístico *maximum likelihood* com o modelo T92+G+I e 1000 repetições de *bootstraps*. (b) Obtida através do método estatístico *maximum likelihood* com o modelo K2+G+I e 1000 repetições de *bootstraps*. Linhas a negrito representam valores de *bootstrap* $\geq 70\%$ e as diversas cores representam a associação específica entre hospedeiro e endossimbionte

4. Conclusão

Este trabalho tinha como objetivo geral caracterizar molecularmente e filogeneticamente isolados portugueses de nemátodes fitoparasitas do género *Xiphinema* e as suas respectivas bactérias endossimbiontes. No caso da amostra (AL02), identificou-se como *X. pachtaicum*, enquanto na amostra (LISB5) identificou-se *X. vallense*, conseguindo-se assim identificar com sucesso as espécies do género *Xiphinema* recorrendo à amplificação dos marcadores moleculares 28S rRNA e COI mtRNA. Na amostra (AL02) identificou-se como bactéria endossimbionte pertencente à família Burkholderiaceae, corroborando trabalhos anteriores que referem a família Burkholderiaceae como endossimbionte do hospedeiro *X. pachtaicum*. Porém na amostra (LISB5) identificou-se como bactéria endossimbionte, o *Candidatus* Xiphinematobacter sp. Foi igualmente possível inferir a relação filogenética dos isolados portugueses de *Xiphinema* e dos respetivos endossimbiontes.

5. Referências Bibliográficas

- Ali, N., Vicente, C. S. L., Mota, M., & Gutiérrez-Gutiérrez, C. (2024). First report of four dagger nematode species of the genus *Xiphinema* (Nematoda: Longidoridae) from banana in Syria using an integrative approach. *European Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s10658-024-02868-3>
- Ankrom, K. E., Franco, A. L. C., Fonte, S. J., Gherardi, L. A., de Tomasel, C. M., Andriuzzi, W. S., Shaw, E. A., Sala, O. E., & Wall, D. H. (2020). Ecto- and endoparasitic nematodes respond differently across sites to changes in precipitation. *Oecologia*, 193(3), 761–771. <https://doi.org/10.1007/s00442-020-04708-7>
- Belval, L., Marmonier, A., Schmitt-Keichinger, C., Gersch, S., Andret-Link, P., Komar, V., Vigne, E., Lemaire, O., Ritzenthaler, C., & Demangeat, G. (2019). From a Movement-Deficient *Grapevine Fanleaf Virus* to the Identification of a New Viral Determinant of Nematode Transmission. *Viruses*, 11(12), 1146. <https://doi.org/10.3390/v11121146>
- Brown, A. M. V. (2018). Endosymbionts of Plant-Parasitic Nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, 56(1), 225–242. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-045824>
- Cobb N. A. (1913). New nematode genera found inhabiting fresh water and non-brackish soils. *Journal of the Washington Academy of Sciences*, 3, 432–444. *Journal of the Washington Academy of Sciences* <https://www.biodiversitylibrary.org/part/20323> (consultado a 18/02/2024)
- Decraemer, W., & Hunt, D. J. (2006). Structure and classification. In R. N. Perry & M. Moens (Eds.), *Plant nematology* (pp. 3–32). Wallingford, UK; Cambridge, MA, USA: CABI. <http://hdl.handle.net/1854/LU-1148336> (consultado a 24/02/2024)
- Elling, A. A. (2013). Major Emerging Problems with Minor *Meloidogyne* Species. *Phytopathology*, 103(11), 1092–1102. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-13-0019-RVW>

- Flores Francisco, B. G., Ponce, I. M., Plascencia Espinosa, M. Á., Mendieta Moctezuma, A., & López y López, V. E. (2021). Advances in the biological control of phytoparasitic nematodes via the use of nematophagous fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(10), 180. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03151-x>
- Galkiewicz, J. P., & Kellogg, C. A. (2008). Cross-Kingdom Amplification Using Bacteria -Specific Primers: Complications for Studies of Coral Microbial Ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(24), 7828–7831. <https://doi.org/10.1128/AEM.01303-08>
- Gu, X.-B., Liu, G.-H., Song, H.-Q., Liu, T.-Y., Yang, G.-Y., & Zhu, X.-Q. (2014). The complete mitochondrial genome of the scab mite *Psoroptes cuniculi* (Arthropoda: Arachnida) provides insights into Acari phylogeny. *Parasites & Vectors*, 7(1), 340. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-340>
- Gutiérrez-Gutiérrez, C., Cantalapiedra-Navarrete, C., Decraemer, W., Vovlas, N., Prior, T., Rius, J. E. P., & Castillo, P. (2012). Phylogeny, diversity, and species delimitation in some species of the *Xiphinema americanum*-group complex (Nematoda: Longidoridae), as inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequences and morphology. *European Journal of Plant Pathology*, 134(3), 561–597. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0039-9>
- Gutiérrez-Gutiérrez, C., Cantalapiedra-Navarrete, C., Remesal, E., Palomares-Rius, J. E., Navas-Cortés, J. A., & Castillo, P. (2013). New insight into the identification and molecular phylogeny of dagger nematodes of the genus *Xiphinema* (Nematoda: Longidoridae) with description of two new species. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 169(3), 548–579. <https://doi.org/10.1111/zoj.12071>
- Gutiérrez-Gutiérrez, C., Castillo, P., Cantalapiedra-Navarrete, C., Landa, B. B., Derycke, S., & Palomares-Rius, J. E. (2011). Genetic Structure of *Xiphinema pachtaicum* and *X. index* Populations Based on Mitochondrial DNA Variation. *Phytopathology*®, 101(10), 1168–1175. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-10-0194>

- Hall, T.A. (1999) BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98
- Heve, W. K., Crow, W. T., Mengistu, T. (2018). Dagger nematodes - *Xiphinema* spp. University of Florida. https://entnemdept.ufl.edu/creatures/nematode/dagger_nematode.htm (consultado a 23/02/2024)
- Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G. J., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G. K., Kikuchi, T., Manzanilla-López, R., Palomares-Rius, J. E., Wesemael, W. M. L., & Perry, R. N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 14(9), 946–961. <https://doi.org/10.1111/mpp.12057>
- Kantor, C., Eisenback, J. D., & Kantor, M. (2024). Biosecurity risks to human food supply associated with plant-parasitic nematodes. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1404335. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1404335>
- Lazarova, S. S., Brown, D. J. F., Oliveira, C. M. G., Fenton, B., MacKenzie, K., Wright, F., Malloch, G., & Neilson, R. (2016). Diversity of endosymbiont bacteria associated with a non-filarial nematode group. *Nematology*, 18(5), 615–623. <https://doi.org/10.1163/15685411-00002982>
- Ley, P. de, Felix, M.-A., Frisse, L., Nadler, S., Sternberg, P., & Thomas, W. K. (1999). Molecular and morphological characterisation of two reproductively isolated species with mirror-image anatomy (Nematoda: Cephalobidae). *Nematology*, 1(6), 591–612. <https://doi.org/10.1163/156854199508559>
- Lo, N., Paraskevopoulos, C., Bourtzis, K., O'Neill, S. L., Werren, J. H., Bordenstein, S. R., & Bandi, C. (2007). Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(3), 654–657. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64515-0>

- Mizrahi-Man, O., Davenport, E. R., & Gilad, Y. (2013). Taxonomic Classification of Bacterial 16S rRNA Genes Using Short Sequencing Reads: Evaluation of Effective Study Designs. *PLoS ONE*, 8(1), e53608. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053608>
- Mnif, I., & Ghribi, D. (2015). Potential of bacterial derived biopesticides in pest management. *Crop Protection*, 77, 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.07.017>
- Mo, Y.-X., Mo, A.-S., Qiu, Z.-Q., Li, B.-X., & Wu, H.-Y. (2021). Systematic Investigation of Plant-Parasitic Nematodes Associated with Main Subtropical Crops in Guangxi Province, China. *Life*, 11(11), 1177. <https://doi.org/10.3390/life11111177>
- Mobasserri, M., Hutchinson, M. C., Afshar, F. J., & Pedram, M. (2019). New evidence of nematode-endosymbiont bacteria coevolution based on one new and one known dagger nematode species of *Xiphinema americanum*-group (Nematoda, Longidoridae). *PLOS ONE*, 14(6), e0217506. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217506>
- Nunn, G.B. (1992), Nematode molecular evolution, Ph.D. dissertation, University of Nottingham, U.K.
- Palomares-Rius, J. E., Archidona-Yuste, A., Cantalapiedra-Navarrete, C., Prieto, P., & Castillo, P. (2016). Molecular diversity of bacterial endosymbionts associated with dagger nematodes of the genus *Xiphinema* (Nematoda: Longidoridae) reveals a high degree of phylogenetic congruence with their host. *Molecular Ecology*, 25(24), 6225–6247. <https://doi.org/10.1111/mec.13904>
- Palomares-Rius, J. E., Cantalapiedra-Navarrete, C., Archidona-Yuste, A., Subbotin, S. A., & Castillo, P. (2017). The utility of mtDNA and rDNA for barcoding and phylogeny of plant-parasitic nematodes from Longidoridae (Nematoda, Enoplea). *Scientific Reports*, 7(1), 10905. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11085-4>

- Palomares-Rius, J. E., Gutiérrez-Gutiérrez, C., Mota, M., Bert, W., Claeys, M., Yushin, V. v., Suzina, N. E., Ariskina, E. v., Evtushenko, L. I., Subbotin, S. A., & Castillo, P. (2021). 'Candidatus Xiphinematocola pachtaicus' gen. nov., sp. nov., an endosymbiotic bacterium associated with nematode species of the genus *Xiphinema* (Nematoda, Longidoridae). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(7). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004888>
- Palomares-Rius, J. E., Hasegawa, K., Siddique, S., & Vicente, C. S. L. (2021). Editorial: Protecting Our Crops - Approaches for Plant Parasitic Nematode Control. *Frontiers in Plant Science*, 12, 726057. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.726057>
- Pires, D., Vicente, C. S. L., Menéndez, E., Faria, J. M. S., Rusinque, L., Camacho, M. J., & Inácio, M. L. (2022). The Fight against Plant-Parasitic Nematodes: Current Status of Bacterial and Fungal Biocontrol Agents. *Pathogens*, 11(10), 1178. <https://doi.org/10.3390/pathogens11101178>
- Poveda, J., Abril-Urías, P., & Escobar, C. (2020). Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes by Filamentous Fungi Inducers of Resistance: Trichoderma, Mycorrhizal and Endophytic Fungi. *Frontiers in Microbiology*, 11, 992. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00992>
- Rocha, F. (2019). Breve visita ao mundo dos nemátodes. <https://dica.madeira.gov.pt/index.php/producao-vegetal/pragas-e-doencas/2729-breve-visita-ao-mundo-dos-nematodes> (consultado a 19/02/2024)
- Schlesner, H., Jenkins, C., & Staley, J. T. (2006). The Phylum Verrucomicrobia: A Phylogenetically Heterogeneous Bacterial Group. In *The Prokaryotes* (3rd ed., Vol. 7, pp. 881–896). Springer New York. https://doi.org/10.1007/0-387-30747-8_37
- Shah, M. M., & Mahamood, M. (2017). Introductory Chapter: Nematodes - A Lesser Known Group of Organisms. In *Nematology - Concepts, Diagnosis and Control. InTech*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68589>

- Sharma, A., Sharma, S. K., Rana, K., & Verma, A. K. (2019). Phylogenetic Analysis of 28S rRNA Gene of Indigenous *Xiphinema pachydermum*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(07), 1960–1968. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.807.233>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Taylor, C. E., & Brown, D. J. F. (1997). Nematode vectors of plant viruses. CAB International.
- University of California, Davis. (2021). *Xiphinema americanum*, Morphology and Anatomy. <http://nemaplex.ucdavis.edu/Taxadata/G143s1.aspx> (consultado a 19/02/2024)
- University of California, Davis. (2021). *Xiphinema index*, Life Cycle. <http://nemaplex.ucdavis.edu/Taxadata/G143s3.aspx> (consultado a 19/02/2024)
- Vicente, M., & Espada M. (2023). A importância dos nemátodes fitoparasitas na sustentabilidade dos sistemas agrícolas. <https://www.med.uevora.pt/pt/a-importancia-dos-nematodes-fitoparasitas-na-sustentabilidade-dos-sistemas-agricolas/> (consultado a 19/02/2024)
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- Wiens, J. J. (2004). The Role of Morphological Data in Phylogeny Reconstruction. *Systematic Biology*, 53(4), 653–661. <https://doi.org/10.1080/10635150490472959>
- Zhao, Y., Zhang, W.-Y., Wang, R.-L., & Niu, D.-L. (2020). Divergent domains of 28S ribosomal RNA gene: DNA barcodes for molecular classification and identification

of mites. *Parasites & Vectors*, 13(1), 251. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04124->

[Z](#)