

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO

Vinícius Marquioni Monteiro

Isolamento e caracterização de vB_XciM_LucasX, um novo
bacteriófago lítico de *Xanthomonas citri* e *Xanthomonas fuscans*

São Carlos – SP

2022

Vinícius Marquioni Monteiro

Isolamento e caracterização de vB_XciM_LucasX, um novo bacteriófago lítico de *Xanthomonas citri* e *Xanthomonas fuscans*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular

Orientadora: Maria Teresa Marques Novo-Mansur

São Carlos – SP

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Vinícius Marquioni Monteiro, realizada em 16/09/2022.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur (UFSCar)

Prof. Dr. Caio Cesar de Melo Freire (UFSCar)

Prof. Dr. Adilson Jose da Silva (UFSCar)

Profa. Dra. Aline Maria da Silva (USP)

Prof. Dr. João Carlos Setubal (USP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas e instituições que, direta ou indiretamente, ajudaram na execução deste projeto de doutorado.

A minha orientadora, Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo-Mansur, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. André Vessoni Alexandrino, por me ajudar a conseguir a amostra de onde o fago LucasX foi isolado.

Aos Profs. Drs. Iran Malavazi e Anderson Ferreira da Cunha, por se disporem a ser membros da minha banca de qualificação e por suas sugestões para a condução do trabalho, e ao Prof. Otavio Henrique Thiemann, por se dispor a ser membro da mesma banca.

A todos que ajudaram na execução dos experimentos e/ou na redação e correção da publicação derivada do projeto: Deborah Cezar Mendonça (IFSC-USP, São Carlos - SP), que me ajudou com a microscopia eletrônica, Tamiris Garcia da Silva (Fundecitrus, Araraquara - SP), que me forneceu algumas das linhagens de *Xanthomonas citri*, Talita Alves dos Santos (Fundecitrus), que conduziu o experimento de controle biológico em citros, Fernando Pacheco Nobre Rossi (IQ-USP, São Paulo - SP), que realizou várias das análises de bioinformática, Dra. Layla Farage Martins (IQ-USP), que fez o sequenciamento genômico, Dr. Franklin Behlau (Fundecitrus), que supervisionou os experimentos de controle biológico, Profa. Dra. Aline Maria da Silva (IQ-USP) e Prof. Dr. João Carlos Setubal (IQ-USP), que supervisionaram os trabalhos realizados na USP - São Paulo e forneceram recursos de seus laboratórios para a execução do projeto.

A todos os membros da banca de doutorado, titulares e suplentes, por se disporem a avaliar esse trabalho e propor melhorias para o mesmo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv - UFSCar), pela oportunidade de cursar o doutorado, à CAPES, pela bolsa de doutorado concedida (processo 88882.426704/2019-01), e à CAPES, ao CNPq e à FAPESP, pelo apoio financeiro ao programa de pós-graduação e ao laboratório LBBMA (Processos JP 07/50910-2 e 2020/05529-3).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Resumo

O cancro cítrico, causado pelas bactérias *Xanthomonas citri* e *Xanthomonas fuscans*, é uma das principais doenças que afetam a citricultura brasileira e mundial. Métodos de controle da doença estão disponíveis, mas novos métodos são necessários. Uma possível forma de combate ao cancro cítrico seria o controle biológico usando bacteriófagos, também chamados de fagos, que são vírus que infectam bactérias e que têm sido propostos como uma alternativa ao uso de outros métodos antibacterianos na agropecuária e na saúde humana. Os objetivos desse trabalho de doutorado eram isolar, sequenciar e caracterizar um ou mais fagos capazes de infectar *Xanthomonas citri*, bem como avaliar seu potencial para controle biológico do cancro cítrico. A partir de uma amostra de terra coletada em um laranjal acometido pelo cancro cítrico foi possível isolar um fago capaz de infectar *X. citri*, linhagem 306, também chamada de Xac 306. O fago tem um genoma de dsDNA de 305.651 pb, possui um conteúdo de GC de 54,92% e trezentas e noventa e quatro ORFs, para cento e oitenta e uma das quais foi possível atribuir funções enquanto duzentas e treze permaneceram como ORFs hipotéticas. As análises filogenética e de microscopia permitiram classificar o fago na família Myoviridae e ele foi denominado vB_XciM_LucasX. LucasX infectou vinte e uma das vinte e três linhagens de *X. citri* e *X. fuscans* contra as quais foi testado. Uma análise de pangenômica com as linhagens cujos genomas já foram sequenciados indicou que uma região de 40 kpb está presente em todas as linhagens suscetíveis, mas ausente na linhagem resistente, o qual deve conter genes essenciais à infecção pelo fago. LucasX pode ser propagado em meio NB mas não em meio LB, provavelmente por não ser resistente a NaCl. LucasX é estável até a 45°C, possui um tempo de latência de 90 min e um *burst size* de 40 UFP/célula infectada, seu pH ótimo é 7 e ele pode ser inativado em concentrações de etanol a partir de 40% ou ao ser exposto à luz UV de uma lâmpada germicida. O rendimento do fago ao ser propagado em meio líquido foi estudado em três linhagens de *Xanthomonas* sp. e foi uma ordem de grandeza maior em uma delas do que na linhagem usada no isolamento. Por fim, um experimento com mudas de laranjeira mantidas em estufa mostrou que LucasX é capaz de reduzir o número de lesões causadas pela infecção por Xac 306 em até 89%, valor equivalente ao de um bactericida comercial usado como controle, indicando seu potencial como agente de controle biológico do cancro cítrico.

Palavras-chave: bacteriófagos, *Xanthomonas*, cancro cítrico, controle biológico

Abstract

Citrus canker, which is caused by the bacteria *Xanthomonas citri* and *Xanthomonas fuscans*, is one of the main diseases that affect the citrus industry in Brazil. Disease control methods are available, but new methods are necessary. A possible way to combat citrus canker is biocontrol using bacteriophages, also called phages, which are viruses that infect bacteria and which have been proposed as an alternative to the use of other antibacterial methods for agriculture and human health. The objectives of this doctoral project were the isolation, sequencing and characterization of one or more phages capable of infecting *Xanthomonas citri*, as well as to assess their potential for biocontrol of citrus canker. From a soil sample collected in a citrus grove affected by citrus canker, we could isolate a phage capable of infecting *X. citri*, strain 306, also known as Xac 306. The phage has a 305,651-bp, dsDNA genome, with a GC content of 54.92% and three hundred ninety-four ORFs, for one hundred eighty-one of which it was possible to assign functions while two hundred and thirteen remained as hypothetical. Phylogenetic and microscopy analysis allowed the classification of the phage in the Myoviridae family and it was named vB_XciM_LucasX. LucasX infected twenty-one of the twenty-three strains of *X. citri* and *X. fuscans* against which it was tested. A pangenomic analysis with the strains whose genome is available indicated that a 40-kbp region is present in all susceptible strains, but absent in the resistant strain, and which must contain genes essential for phage infection. LucasX can be propagated in NB medium but not in LB medium, probably because it is not tolerant to NaCl. LucasX is stable up to 45°C, has a latent period of 90 min and a burst size of 40 PFU/infected cell, its optimal pH is 7 and it can be inactivated with 40% ethanol or by being exposed to UV light from a germicidal lamp. The phage yield in liquid medium was studied in three strains of *Xanthomonas* sp. and it was one order of magnitude higher in one of them relative to the strain used for isolation. Finally, an experiment with citrus trees kept in a greenhouse showed that LucasX is able to reduce the number of lesions caused by Xac 306 by up to 89%, a reduction similar to that of a commercial bactericide used as a control, thus indicating its potential as a biocontrol agent for citrus canker.

Keywords: bacteriophages, *Xanthomonas*, citrus canker, biocontrol

Lista de figuras

Figura 1. Lesões causadas pelo cancro em folhas e frutos (fonte: https://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro).....	10
Figura 2. Quebra-vento em pomar de citros (esq.) e folha atacada por <i>Phyllocnistis citrella</i> (dir.) (fontes: https://citrusindustry.net/2019/01/15/windbreaks-for-citrus/ e https://citrusindustry.net/2021/01/25/control-methods-for-major-pests-of-cold-hardy-citrus/)	11
Figura 3. Microscopia eletrônica de fagos: uma das primeiras micrografias eletrônicas publicadas, mostrando fagos atacando <i>E. coli</i> (esq.), o fago T4 puro (centro) e o fago vB_EcoP_SU10 atacando <i>E. coli</i> (dir.) (fontes: RUSKA, 1940, MILLER et al., 2003 e MIRZAEI et al., 2014, adaptado).....	12
Figura 4. Morfologia das famílias da ordem Caudovirales: Myoviridae (esq.), Podoviridae (centro) e Siphoviridae (dir.) (fonte: https://en.wikipedia.org/wiki/Caudovirales).....	14
Figura 5. Microscopia eletrônica de transmissão do fago LucasX, mostrando sua cauda em conformação estendida (esq.) e retraída (dir.).....	27
Figura 6. Genoma do fago LucasX, mostrando as ORFs anotadas.....	30
Figura 7. Filogenia do fago LucasX.....	31
Figura 8. Crescimento e estabilidade do fago LucasX.....	32
Figura 9. <i>Spot test</i> de uma linhagem suscetível (XauB 11122) e uma resistente (XauB 1565)	33
Figura 10. Comparação entre o tamanho das placas de lise (acima) e o rendimento do fago no cultivo em meio líquido (abaixo) entre as linhagens Xac 306, Xac 636 e XauC 752	34
Figura 11. SDS-PAGE das proteínas totais da linhagem de expressão da proteína codificada pela ORF LUCX_133 completa antes da indução com IPTG, após 4h de indução e após 18h de indução	35
Figura 12. Genes conservados nas linhagens suscetíveis e ausentes na linhagem resistente mapeados no cromossomo de Xac 306.....	36
Figura 13. Alinhamento dos oito genomas analisados na pangenômica, com a região de 40 kpb em destaque.....	37
Figura 14. Organização da região de 40 kpb no cromossomo de Xac 306.....	37
Figura 15. Resultado do teste de controle biológico com o fago LucasX	39

Lista de tabelas

Tabela 1. Linhagens de <i>X. citri</i> e <i>X. fuscans</i> usadas nesse projeto	18
Tabela 2. <i>Primers</i> usados para amplificação das três sequências nucleotídicas de interesse	24
Tabela 3. Experimento de controle biológico	26
Tabela 4. Características do genoma do fago LucasX	29

Sumário

1	Introdução	9
2	Objetivos.....	16
2.1	Objetivos gerais.....	16
2.2	Objetivos específicos.....	16
3	Metodologia.....	17
3.1	Linhagens e condições de cultivo.....	17
3.2	Isolamento e propagação de fagos.....	18
3.3	Microscopia eletrônica de transmissão.....	19
3.4	Sequenciamento, montagem e anotação do genoma	19
3.5	Filogenia.....	20
3.6	Curva de crescimento e estabilidade	21
3.7	Espectro de hospedeiros	22
3.8	Rendimento do fago em três linhagens hospedeiras	22
3.9	Clonagem e expressão recombinante de proteínas do fago.....	23
3.10	Análise pangenômica	24
3.11	Teste de controle biológico	25
4	Resultados.....	27
4.1	Isolamento e propagação de fagos.....	27
4.2	Microscopia eletrônica de transmissão.....	27
4.3	Sequenciamento, montagem e anotação do genoma	28
4.4	Filogenia.....	31
4.5	Curva de crescimento e estabilidade	31
4.6	Espectro de hospedeiros	33
4.7	Rendimento do fago em três linhagens hospedeiras	33
4.8	Clonagem e expressão recombinante de proteínas do fago.....	34
4.9	Análise pangenômica	35
4.10	Teste de controle biológico	38
5	Discussão	40
6	Conclusões.....	47
7	Referências	48
8	Anexo A – Publicação derivada do trabalho	57
9	Anexo B – ORFs anotadas no genoma do fago vB_XciM_LucasX	58
10	Anexo C – Sequências codificantes das proteínas clonadas.....	66
11	Anexo D – Outras atividades	67

1 Introdução

O cancro cítrico é uma das principais doenças da citricultura brasileira e mundial. Juntamente com a clorose variegada dos citros (CVC ou “amarelinho”), causada por *Xylella fastidiosa*, e o *huanglongbing* (HLB ou *greening*), causado por espécies do gênero *Candidatus Liberibacter*, o cancro é uma das mais importantes doenças bacterianas que atingem os citros, causando enormes prejuízos ao setor citrícola (FERENCE et al., 2018; VOJNOV et al., 2010).

A forma mais agressiva da doença é o cancro cítrico asiático ou cancro A, que é causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (também conhecida como *X. citri* pv. *citri* A). O cancro A acomete todas as espécies de citros e é encontrado em países do mundo todo (FERENCE et al., 2018; VOJNOV et al., 2010). Também são reconhecidas outras duas formas da doença, os cancros B e C, causados pelas bactérias *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* B e C (também conhecidas como *X. citri* pv. *aurantifolii* B e C) (MOREIRA et al., 2010). O cancro B ocorre na América do Sul e só acomete limões (*Citrus limon*) e limas ácidas (*Citrus aurantifolia*). Já o cancro C só ocorre no estado de São Paulo e acomete apenas limas ácidas galego (BEHLAU; GOCHEZ; JONES, 2020).

X. citri é uma bactéria Gram-negativa, de formato cilíndrico, medindo de 1,5 a 2 μm , catalase positiva e oxidase negativa, dotada de um flagelo polar que lhe permite se deslocar por curtas distâncias. O patógeno atinge as plantas carregado pelo vento e pela chuva e pode penetrar nos tecidos vegetais através de ferimentos ou pelos estômatos (GOTO, 1992). Dentro da planta, a bactéria adere à parede celular e, ao atingir densidade suficiente, perde o flagelo e começa a formar um biofilme composto por um exopolissacarídeo chamado xantana (GRAHAM et al., 2004). O cancro causa o aparecimento de lesões de cor marrom de até 12 mm em folhas, frutos e ramos, cercadas por um halo amarelo nas folhas e nos frutos (Figura 1). O cancro em frutos geralmente não compromete a qualidade do suco, mas diminui seu valor de mercado e impede sua venda para países em que a doença não ocorre. A infecção não é letal para a planta, mas leva à queda prematura de folhas e frutos, diminuindo a produtividade (BRUNINGS; GABRIEL, 2003).

Figura 1. Lesões causadas pelo cancro em folhas e frutos (fonte: <https://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro>)



De acordo com um levantamento feito pelo Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) no cinturão citrícola brasileiro, que inclui parte dos estados de São Paulo e de Minas Gerais, o percentual de árvores com sinais do cancro aumentou continuamente de 8,68% em 2017 até 17,26% em 2020. Esse percentual caiu para 15,61% em 2021, valor menor que o percentual de árvores acometidas pelo *greening* (22,37%), mas maior que o de árvores acometidas pela CVC (0,46%) no mesmo ano. Apesar da redução da incidência em 2021, o cancro cítrico continua presente em todos os setores do cinturão citrícola e ocorre em laranjeiras em todos os estratos de idade, sendo a incidência maior em laranjeiras de 3 a 5 anos e menor em plantas mais novas e mais velhas. Esse padrão é diferente do observado para o *greening* e a CVC, que tiveram incidência maior apenas em plantas mais velhas. A incidência do cancro também variou de acordo com o número de plantas nas propriedades, sendo maior em propriedades com menos plantas, comportamento semelhante ao do *greening* e da CVC (FUNDECITRUS, 2021).

O levantamento do Fundecitrus menciona que a menor incidência do cancro em 2021 (em relação a 2020) pode ser atribuída à redução das chuvas no período e alerta para a necessidade de se manterem as medidas de controle da doença. O levantamento menciona ainda que a menor incidência do cancro em 2021, embora positiva para o setor citrícola, afetou negativamente as pesquisas em andamento no campo, já que a baixa incidência da doença em plantas não tratadas com bactericidas

impossibilitou a comparação com plantas tratadas, dificultando a obtenção de dados confiáveis sobre esses produtos (FUNDECITRUS, 2021).

Entre as medidas de combate ao cancro estão a eliminação das árvores infectadas, a aplicação de bactericidas à base de cobre, o plantio de quebra-ventos nos limites dos pomares e entre talhões (para evitar a disseminação da bactéria pelo vento e pela chuva), o uso de variedades de citros menos suscetíveis e o controle do inseto *Phyllocnistis citrella*, conhecido como larva-minadora-dos-citros, que facilita a penetração da bactéria por escavar galerias nas folhas (Figura 2) (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002).

Figura 2. Quebra-vento em pomar de citros (esq.) e folha atacada por *Phyllocnistis citrella* (dir.) (fontes: <https://citrusindustry.net/2019/01/15/windbreaks-for-citrus/> e <https://citrusindustry.net/2021/01/25/control-methods-for-major-pests-of-cold-hardy-citrus/>)

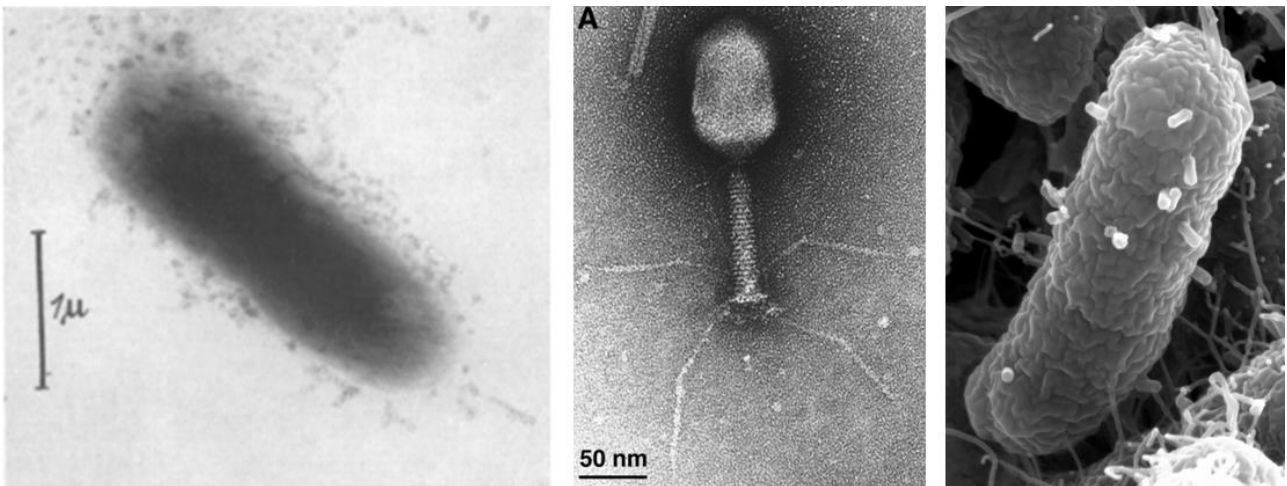


A aplicação de bactericidas à base de cobre é amplamente utilizada no combate ao cancro cítrico, mas essa medida não gera efeitos duradouros, não impede que bactérias trazidas pela chuva e pelo vento penetrem diretamente nos estômatos e pode ainda prejudicar o crescimento de raízes e a absorção de nutrientes (FERENCE et al., 2018). Além disso, há relatos de linhagens de *X. citri* resistentes a cobre (BEHLAU; GOCHEZ; JONES, 2020; RICHARD et al., 2017). O uso de quebra-ventos nos pomares e o combate à larva-minadora-dos-citros também são bastante utilizados na prevenção do cancro, mas os quebra-ventos apenas dificultam a disseminação da bactéria, não impedindo o desenvolvimento do cancro em plantas já expostas a *X. citri*, enquanto que o combate à larva-minadora exige o uso constante de inseticidas (CANTEROS, 2004; FERENCE et al., 2018). Uma estratégia que tem sido proposta por diversos grupos de pesquisa é a utilização de plantas transgênicas expressando proteínas de controle de *quorum sensing*, *pattern recognition receptors* e

peptídeos antimicrobianos, que as tornam resistentes à infecção (CASERTA et al., 2014; HAO et al., 2016; HAO; ZHANG; STOVER, 2017). Entretanto, o uso de plantas transgênicas possui diversas dificuldades regulatórias e a liberação comercial de uma nova variedade transgênica pode ser demorada.

Uma abordagem que poderia ser usada para combater o cancro cítrico é o controle biológico com bacteriófagos, também chamados de fagos, que são vírus que infectam bactérias (Figura 3). Fagos foram descritos pela primeira vez em dois trabalhos independentes em 1915 e 1917 (D'HERELLE, 1917; TWORT, 1915), embora talvez tenham sido observados desde o final do século XIX (ABEDON et al., 2011), e sua capacidade de infectar e matar bactérias foi explorada no tratamento de doenças em seres humanos no começo do século XX (SALMOND; FINERAN, 2015; SUMMERS, 2012).

Figura 3. Microscopia eletrônica de fagos: uma das primeiras micrografias eletrônicas publicadas, mostrando fagos atacando *E. coli* (esq.), o fago T4 puro (centro) e o fago vB_EcoP_SU10 atacando *E. coli* (dir.) (fontes: RUSKA, 1940, MILLER et al., 2003 e MIRZAEI et al., 2014, adaptado)



Fagos associados a plantas foram relatados pela primeira vez em 1924, quando se demonstrou que um filtrado de repolhos em decomposição inibia o crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, responsável pelo apodrecimento da planta (MALLMANN; HEMSTREET, 1924). Em 1926 foi proposto o uso de fagos como agentes de controle de doenças bacterianas em plantas (MOORE, 1926), o que foi feito uma década depois no tratamento de sementes para se prevenir a infecção de milho pela bactéria *Pantoea stewartii* (THOMAS, 1935).

A partir dos anos 1940, entretanto, o interesse por fagos se deu principalmente na área de pesquisa básica, quando fagos se tornaram um importante modelo de estudos em biologia molecular, permitindo descobertas sobre a natureza do material genético e a estrutura dos genes (KEEN, 2015). O uso de fagos na agricultura ressurgiu nos anos 1970, quando foi testado contra *Ralstonia solanacearum* e *Erwinia amylovora* (VIDAVER, 1976).

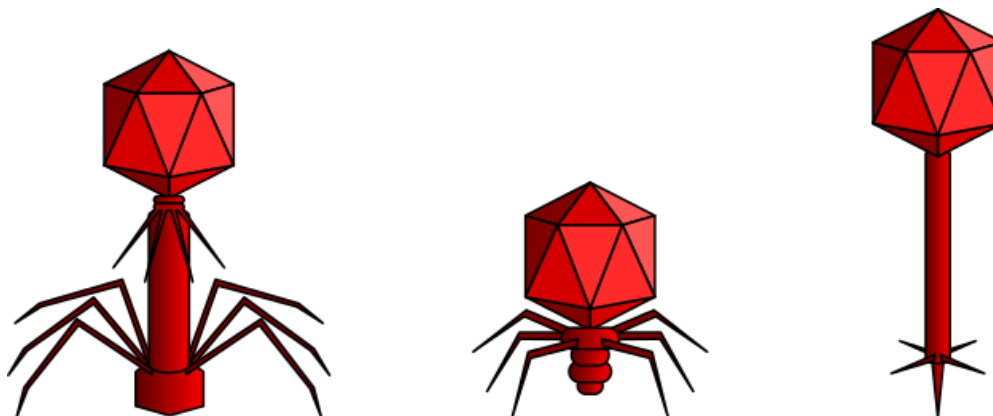
Fagos também estão associados à origem de diversas ferramentas de biologia molecular: enzimas de restrição, sistemas de clonagem e expressão recombinante, a técnica de *phage display*, o sistema CRISPR/Cas para edição de genomas, entre outros (SALMOND; FINERAN, 2015). Fagos também são importantes no entendimento das relações ecológicas e evolutivas. Acredita-se que fagos sejam as entidades biológicas mais abundantes do planeta, com uma quantidade estimada em cerca de 10^{31} partículas virais (CLOKIE et al., 2011), e sua relevância como moduladores de populações de bactérias tem sido demonstrada (BARR et al., 2013; DANOVARO et al., 2011; DÍAZ-MUÑOZ; KOSKELLA, 2014).

Assim como vírus de eucariotos, fagos são formados por um capsídeo proteico que envolve seu material genético, que pode ser DNA ou RNA, em fita simples ou dupla. Além disso, fagos são parasitas intracelulares obrigatórios, dependendo de seus hospedeiros para a replicação de seu material genético, para a síntese de suas proteínas e para a montagem de novas partículas virais. Fagos podem apresentar dois tipos de ciclo de vida, chamados de lítico e lisogênico. No ciclo lítico, uma ou mais partículas virais aderem à superfície de uma célula hospedeira e seu material genético é inserido nessa célula. Uma vez dentro da célula, o material genético é replicado e expresso para a síntese de proteínas virais. Por fim, novas partículas virais são montadas e liberadas para o meio extracelular, em geral por meio da lise da célula hospedeira, e o ciclo pode então se repetir com outras células. Já no ciclo lisogênico, o material genético do fago é integrado ao genoma da célula hospedeira, podendo ser replicado como parte dele ao longo da multiplicação da bactéria, mas podendo se excisar em algum momento posterior dependendo das condições ambientais, dando início ao ciclo lítico. Fagos que passam apenas pelo ciclo lítico são chamados de fagos líticos, enquanto que fagos que passam por ambos os ciclos são chamados de fagos temperados (SNYDER et al., 2013).

Fagos são classificados em famílias de acordo com seu tipo de genoma e a morfologia de seu capsídeo. A maioria dos fagos conhecidos pertence à ordem Caudovirales, formada por fagos com genoma de dsDNA, e que inclui três famílias: Myoviridae, Podoviridae e Siphoviridae. Os fagos da família Myoviridae têm uma cauda longa, retrátil e rígida, os da família Podoviridae têm uma cauda curta e os da família Siphoviridae têm uma cauda longa, não retrátil e flexível (Figura 4) (NOBREGA

et al., 2018). Sua classificação taxonômica depende, portanto, de análises de microscopia eletrônica de transmissão (ACKERMANN, 2009).

Figura 4. Morfologia das famílias da ordem Caudovirales: Myoviridae (esq.), Podoviridae (centro) e Siphoviridae (dir.) (fonte: <https://en.wikipedia.org/wiki/Caudovirales>)



O uso de bacteriófagos para controle de bactérias fitopatogênicas tem sido bastante relatado na literatura recente. Há artigos descrevendo a aplicação de fagos na proteção de variedades como batata (BAE et al., 2012; CZAJKOWSKI et al., 2015; WEI et al., 2017), tomate (BHUNCHOTH et al., 2015; FUJIWARA et al., 2011), alface (BOYACIOGLU et al., 2013; FERGUSON et al., 2013; LIM et al., 2013), alho-poró (ROMBOUTS et al., 2016), uva (DAS et al., 2015), maçã, pera, melão (OLIVEIRA et al., 2014), entre outros. Entretanto, o uso de fagos no combate ao cancro cítrico ainda é pouco descrito. BALOGH et al. (2008) relatam o uso de oito fagos com essa finalidade em um experimento conduzido com *grapefruit*, mas não fornecem informações sobre a caracterização dos fagos utilizados. Já IBRAHIM; SALEH; AL-SALEH (2017) conduziram experimentos com laranjeiras propriamente ditas, mas também não forneceram informações sobre a caracterização dos seis fagos usados, além de não terem avaliado seu espectro de hospedeiros, tendo utilizado uma única linhagem de *X. citri*. Em nenhum desses dois trabalhos os autores relatam o sequenciamento dos fagos utilizados.

Em 2005, a empresa OmniLytics registrou junto à Agência de Proteção Ambiental dos EUA o primeiro pesticida à base de fagos, chamado *AgriPhage*, para controle de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em tomate e pimentão (NAGY; KIRÁLY; SCHWARCZINGER, 2012). Mais recentemente, a mesma empresa lançou uma nova versão do *AgriPhage*, voltada para o combate do cancro cítrico em plantações, mas não foram encontradas na

literatura avaliações de sua utilização. Além da OmniLytics, empresas como IntraLytx e Phagelux também já comercializam preparações de fagos para controle biológico na agricultura e para segurança alimentar. No Brasil, no entanto, não há relatos da aplicação de pesticidas à base de fagos.

Além disso, o conhecimento sobre fagos de *X. citri* ainda é limitado. Há poucos trabalhos recentes descrevendo fagos de *Xanthomonas* spp., sendo que a maioria deles envolve fagos de espécies que não *X. citri* (BROWN et al., 2016; CHAE et al., 2014; DÖMÖTÖR et al., 2016; HONG et al., 2018; ROMERO-SUAREZ; JORDAN; HEINEMANN, 2012; YEH, 2017). Mais recentemente, YOSHIKAWA et al. (2018) relataram o isolamento e caracterização de um jumbo fago (um fago com mais de 200 kpb) que foi denominado XacN1 e que foi capaz de infectar nove linhagens de *X. citri*. A maioria dos trabalhos sobre fagos de *Xanthomonas* sp., entretanto, envolve fagos que já eram conhecidos mas ainda não caracterizados, como os fagos Cp1 e Cp2, usados para tipagem de linhagens de *Xanthomonas* (AHMAD et al., 2014). Também já foram descritos fagos que mostraram reatividade cruzada com *X. citri*, mas que foram isolados em outros hospedeiros, como *Xylella fastidiosa* (AHERN et al., 2014). Por fim, também já foram descritos fagos de *Xanthomonas* spp. como os fagos XacF1, Cf2 e Xf109 (AHMAD et al., 2017; YEH, 2017, 2020) e que podem não ser apropriados para controle biológico do cancro cítrico por serem temperados.

2 Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Os objetivos gerais desse projeto de doutorado eram isolar e caracterizar fagos que infectassem *X. citri* e avaliar seu potencial uso como agentes de controle biológico do cancro cítrico.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos desse projeto de doutorado eram:

- Isolar e propagar fago capaz de infectar *X. citri* usando-se a linhagem Xac 306 como hospedeiro;
- Sequenciar, montar e anotar o genoma do fago isolado, bem como estudar sua relação filogenética com outros fagos;
- Determinar o espectro de hospedeiros, a morfologia, o padrão de crescimento e a estabilidade do fago isolado em diversas condições de temperatura, pH, etc;
- Clonar os genes de proteínas possivelmente líticas do fago isolado, expressá-las de forma recombinante em *E. coli* e avaliar sua atividade;
- Comparar o genoma de linhagens suscetíveis e não suscetíveis por uma análise pangenômica;
- Avaliar a capacidade do fago isolado de impedir a infecção por *X. citri* em ensaios *in vivo*.

3 Metodologia

3.1 Linhagens e condições de cultivo

As espécies *X. citri*, *X. fuscans aurantifolii* B e *X. fuscans aurantifolii* C serão aqui denominadas Xac, XauB e XauC, respectivamente. As linhagens de Xac, XauB e XauC usadas nesse projeto são mostradas na Tabela 1 e foram fornecidas pelo Fundo de Defesa da Citricultura - Fundecitrus (Araraquara- SP). A linhagem usada no isolamento do fago foi a Xac 306, a primeira linhagem de *X. citri* a ser sequenciada (DA SILVA et al., 2002). Estoques das bactérias foram mantidos a -80°C em glicerol 20% até o momento do uso, quando as células foram estriadas em meio ágar-nutriente (*Difco Nutrient Agar*, BD), aqui denominado meio NA, e incubadas a 30°C por 24-48h. Colônias foram propagadas em meio caldo nutriente (*Difco Nutrient Broth*, BD), aqui denominado meio NB, a 30°C sob agitação de 250 rpm por 24h.

Para o plaqueamento do fago, usado no isolamento, na quantificação, na avaliação de estabilidade, etc, foi usado o método de dupla camada, também denominado *double layer* ou *overlay*. Em cada plaqueamento, 100 µL da amostra de fago foram misturadas a 200 µL da linhagem hospedeira em alíquotas de 3 mL de meio NA semi-sólido (preparado com meio NB na concentração recomendada pelo fabricante acrescido de ágar a 0,4% e distribuído em tubos de ensaio). Os tubos de ensaios foram previamente aquecidos a 45°C para se derreter o meio antes da adição dos fagos e das bactérias. Em cada plaqueamento, após a mistura do fago e da bactéria hospedeira no meio semi-sólido liquefeito, a mistura foi vertida sobre uma camada de meio NA e incubado *overnight* a 30°C.

Tabela 1. Linhagens de *X. citri* e *X. fuscans* usadas nesse projeto

Patótipo	Linhagem	Accession number (NCBI)
Xac	Xac 306/12	AE008923.1 (cromossomo), AE008925.1 (pXAC64), AE008924.1 (pXAC33)
	Xac IBSBF 1421/75	-
	Xac FDC 1301/636	LAUQ00000000.1 (<i>contigs</i>)
	Xac FDC 1298	-
	Xac FDC 18	-
	Xac FDC 22	-
	Xac FDC 38	-
	Xac FDC 58	-
	Xac FDC 118	-
	Xac FDC 121	-
	Xac FDC 601	-
	Xac FDC 604	-
	Xac FDC 612	-
	Xac FDC 624	-
XauB	XauB 11122/1631	ACPX00000000.1 (<i>contigs</i>)
	XauB IBSBF 1583/1565	-
	XauB 1566	CP012002.1 (cromossomo), CP012003.1 (pXfb35)
XauC	XauC 10535	ACPY00000000.1 (<i>contigs</i>)
	XauC FDC 763	LAUI00000000.1 (<i>contigs</i>)
	XauC FDC 828	LAUP00000000.1 (<i>contigs</i>)
	XauC FDC 725	-
	XauC FDC 535	LAUH00000000.1 (<i>contigs</i>)
	XauC FDC 752	-

3.2 Isolamento e propagação de fagos

Uma amostra de terra coletada em um pomar de citros na cidade de Matão, SP, onde havia plantas acometidas pelo cancro cítrico, foi usada para o isolamento de fagos, seguindo-se o protocolo proposto por YOSHIKAWA et al. (2018). 6 g dessa amostra (cerca de 5 mL) foram misturados com meio NB até um volume de 15 mL em um tubo de 50 mL. Para enriquecer a amostra com fagos que infectassem Xac 306, a essa amostra foram acrescentados 100 µL de um cultivo *overnight* de Xac 306, também feito em NB. Essa mistura foi incubada *overnight* a 30°C sob agitação de 250 rpm e depois centrifugada a 7.000 g por 15 min. O sobrenadante foi coletado, filtrado em uma membrana com diâmetro de poros de 0,22 µm e plaqueado pelo método de dupla camada. Uma placa de lise observada após o plaqueamento foi coletada com uma pipeta Pasteur e depositada em meio NB para exsudação dos fagos. A amostra foi diluída serialmente e o procedimento foi repetido mais duas vezes para se garantir a obtenção de um fago puro. A amostra foi armazenada a 4°C em NB.

Para propagação em meio líquido, alíquotas de 100 µL do fago contendo cerca de 10^5 UFP foram misturadas com 100 µL de Xac 306 (cultivada *overnight*) em 10 mL de meio NB em tubos de 50 mL. Os tubos foram incubados *overnight* a 30°C sob agitação de 250 rpm e centrifugados. Os sobrenadantes foram coletados e filtrados como descrito anteriormente. As amostras foram diluídas serialmente para quantificação por plaqueamento. As amostras foram armazenadas a 4°C em NB e a -20°C e -80°C em NB acrescido de glicerol 20%.

3.3 Microscopia eletrônica de transmissão

A análise da morfologia do fago por microscopia eletrônica de transmissão foi feita por Deborah Cezar Mendonça (IFSC-USP). Um *grid* de cobre revestido com um filme de carbono (PELCO) foi carregado negativamente em um equipamento easyGlow™ Glow Discharge Cleaning System (PELCO). 3 µL da amostra de fagos obtida anteriormente (10^9 UFP/mL) foram depositados no *grid*, seguidos de 3 µL de água e 3 µL de acetato de uranilo 2% para coloração negativa. O excesso de líquido foi removido com papel filtro. O *grid* foi analisado a 200 kV em um microscópio JEM-2100 (JEOL). Os arquivos em formato .dm3 gerados pelo microscópio foram analisadas no programa *Gatan Microscopy Suite* (GMS 3) e as imagens foram exportadas em formato .tif.

3.4 Sequenciamento, montagem e anotação do genoma

Para a extração de DNA genômico foram usados 2 mL da amostra de fagos obtida anteriormente (10^9 UFP/mL). Para se removerem exopolissacarídeos produzidos pela Xac 306, a amostra foi misturada com um mesmo volume de clorofórmio e 0,7 M de NaCl. Depois de uma centrifugação, a fase aquosa foi coletada e submetida por duas vezes à extração líquido-líquido com o mesmo volume de uma mistura de fenol-clorofórmio (1:1, v:v) e uma vez à extração com clorofórmio puro. O DNA foi precipitado da fase aquosa com 0,6 volume de isopropanol e 0,1 volume de acetato de sódio 3 M, lavado com etanol 70% e dissolvido em 200 µL de água. A concentração da amostra e a razão entre as absorbâncias a 260 nm e 280 nm, determinadas em um NanoVue (GE), foram de 80 ng/µL e 1,8, respectivamente.

O sequenciamento do genoma foi feito pela Dra. Layla Farage Martins (IQ-USP, São Paulo - SP). Para isso, o DNA foi novamente quantificado com o *Quant-iT Picogreen dsDNA assay kit* (Life Technologies, EUA). A biblioteca foi preparada com um *kit Nextera* (Illumina, EUA) e purificada com *beads Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter, EUA). O tamanho médio dos fragmentos, determinado em um 2100 Bioanalyzer, foi de 665 pb. A quantificação, normalização e

sequenciamento foram feitos com o *KAPA Library Quantification Kit*, de acordo com as recomendações do fabricante para sequenciamento em um sequenciador Illumina MiSeq. O sequenciamento foi feito com o *MiSeq Reagent Kit v2 (paired-end reads, 2 x 250 ciclos)*. As *reads* obtidas pelo sequenciamento dos fragmentos pelas duas extremidades, indicadas como R1 e R2, tiveram, respectivamente, mais de 80% e 60% de bases com um *score* Phred igual ou superior a 30.

A qualidade das *reads* foi checada com o programa FastQC (“Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data”, [s.d.]). Como a qualidade das *reads* R1 era bem maior do que a das *reads* R2, apenas as *reads* R1 (cerca de 2 milhões) foram usadas na montagem do genoma. As extremidades de baixa qualidade das *reads* foram removidas com o programa Trimmomatic (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014) com os seguintes parâmetros: ILLUMINACLIP:Trimmomatic-0.38/adapters/NexteraPE-PE.fa:2:30:10, LEADING:30, TRAILING:30, SLIDINGWINDOW:4:30 e MINLEN:220. Após essa etapa, restaram cerca de 920 mil *reads*. *Reads* contaminantes, ou seja, com similaridade com o genoma de Xac 306, foram removidas com o programa bbdutk (BUSHNELL, 2014) e, após essa etapa, restaram cerca de 610 mil *reads*. A montagem foi feita com o programa SPAdes (BANKEVICH et al., 2012), com parâmetros padrão. Por fim, as *reads* foram mapeadas no genoma montado com o programa Bowtie 2 (LANGMEAD; SALZBERG, 2012). A busca de ORFs e de genes de tRNA foi feita com o programa RASTtk (BRETTIN et al., 2015) e as proteínas codificadas por cada ORF foram buscadas contra o NCBI com o programa blastp. Terminadores Rho-independentes foram buscados com o programa ARNold.

Outras análises foram feitas por Fernando Pacheco Nobre Rossi (IQ-USP) sob supervisão da Prof. Aline Maria da Silva e Prof. Dr. João Setúbal (IQ-USP, S. Paulo). A predição de ORFs foi refeita com o programa PHANOTATE (MCNAIR et al., 2019), seguida de buscas com o HMMER3 (EDDY, 2011) contra o Viral Orthologs Groups (<https://vogdb.org>). O programa DeepCapTail (ABID; ZHANG, 2018) foi usado para a predição de proteínas estruturais (capsídeo e cauda). Um mapa linear do genoma foi gerado com a biblioteca Python DNAFeaturesViewer (<https://github.com/Edinburgh-Genome-Foundry/DnaFeaturesViewer>). As ORFs anotadas estão disponíveis no Anexo B.

3.5 Filogenia

A análise filogenética também foi feita por Fernando Pacheco Nobre Rossi (IQ-USP, São Paulo - SP). Dois conjuntos de dados de genomas de fagos foram usados para a análise ANI (*average*

nucleotide analysis) usando-se o programa PyANI (<https://github.com/widdowquinn/pyani>). Um deles continha todos os fagos de *Xanthomonas* do RefSeq do banco de dados de vírus do NCBI e o outro continha todos os jumbo fagos do RefSeq e do banco de dados do Millard Lab, disponível em <http://millardlab.org/bioinformatics/bacteriophage-genomes/phage-genomes-jul2021/>. Para a análise de clusterização de proteomas, o genoma do fago foi analisado usando-se o programa vContact2 (BOLDUC et al., 2017) com o banco de dados do Millard Lab, contendo 15.313 genomas. Os fagos mais próximos foram recuperados e uma nova análise foi feita apenas com eles. Os *clusters* de proteínas resultantes foram avaliados quanto à presença e ausência de cada fago para se gerar um *heatmap* e uma análise de *clusters* hierárquica. Um conjunto de *clusters* proteicos foi recuperado, as proteínas de todos os fagos foram concatenadas e alinhadas e o resultado foi usado para se calcular uma árvore filogenética de máxima verossimilhança usando-se o programa FastTree (PRICE; DEHAL; ARKIN, 2009) com modelo wag, otimização gamma e 1000 bootstraps. A árvore resultante foi visualizada com o programa FigTree (<https://github.com/rambaut/figtree/releases/tag/v1.4.4>).

3.6 Curva de crescimento e estabilidade

Para se construir a curva de crescimento do fago foram centrifugados 5 mL de um cultivo *overnight* de Xac 306 em NB. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em 500 μ L de NB e misturadas com 100 μ L de uma amostra de fagos contendo 10^5 UFP/mL. A MOI (*multiplicity of infection*, ou seja, a razão entre o número de fagos e o de células) foi de 4×10^{-6} . A mistura foi incubada a 30°C por 5 min sob agitação de 250 rpm para permitir a adesão dos fagos às células. A amostra foi centrifugada e o sobrenadante foi descartado para se removerem os fagos livres. O *pellet* foi então suspenso em 10 mL de NB e a amostra foi incubada a 30°C sob agitação de 250 rpm. Alíquotas de 100 μ L foram tiradas a cada 30 min, misturadas com 100 μ L de Xac 306 de outro cultivo *overnight* e plaqueadas. Como um experimento preliminar havia indicado que a lise celular deveria ocorrer após 2,5 h, o intervalo entre a retirada de alíquotas foi reduzido para 15 min após 2 h de incubação e as alíquotas foram diluídas 20 vezes antes da mistura com Xac 306 para plaqueamento. O experimento foi feito em triplicata.

Para se determinar a estabilidade térmica do fago, amostras contendo uma mesma quantidade de fagos foram incubadas por 30 min em temperaturas de 30°C a 55°C em um termociclador e então plaqueadas como descrito anteriormente.

Para se determinar a tolerância do fago a NaCl, amostras contendo uma mesma quantidade de fagos foram plaqueadas como descrito anteriormente, mas com NaCl acrescentado tanto ao meio sólido quanto ao semi-sólido em concentrações de 0 g/L a 5 g/L.

Para se determinar a tolerância do fago à luz UV, alíquotas com cerca de 135 µL do fago foram pipetadas em placas de Petri vazias e expostas à luz germicida de uma cabine de segurança biológica (Aistream Class II Type A2 BSC, Esco). As placas de Petri foram colocadas a 60 cm da lâmpada, que tem um pico de emissão em 253,7 nm e as amostras foram plaqueadas como descrito anteriormente após serem expostas à luz UV por 0 s a 160 s.

Para se determinar a estabilidade do fago em diferentes pHs, amostras contendo uma mesma quantidade do fago foram incubadas por 30 min em soluções com pH variando de 3 a 11, diluídas e plaqueadas como descrito anteriormente. Para se determinar a tolerância do fago a etanol, amostras do fago foram incubadas por 30 min em concentrações de etanol variando de 0% a 80%, diluídas e plaqueadas como descrito anteriormente.

Todos os experimentos descritos acima foram feitos em triplicata.

3.7 Espectro de hospedeiros

O espectro de hospedeiros do fago foi estudado entre as vinte e três linhagens de Xac, XauB e XauC listadas na Tabela 1. Foram usados dois métodos, o plaqueamento em dupla camada e o *spot test*. O plaqueamento foi feito como descrito anteriormente, usando-se como hospedeiro cada uma das linhagens e uma quantidade conhecida do fago. No caso do *spot test*, as linhagens foram cultivadas em meio NB e estriadas em placas de Petri contendo meio NA. Após alguns minutos (para secagem das estrias), 2 µL da amostra de fago obtida anteriormente (10^9 UFP/mL) foram gotejados no centro da estria. O aparecimento de placas de lise no caso do plaqueamento e de uma zona de inibição do crescimento bacteriano no caso do *spot test* indicaria que a linhagem era suscetível à infecção.

3.8 Rendimento do fago em três linhagens hospedeiras

Das vinte e uma linhagens usadas no estudo do espectro de hospedeiros e que se mostraram suscetíveis à infecção, duas produziram placas de lise visivelmente maiores que as demais quando usadas como hospedeiras, as linhagens Xac 636 e XauC 752. Esse resultado sugeria que essas duas linhagens pudessem ser mais propícias para a propagação do fago em meio líquido do que a linhagem

Xac 306, usada no isolamento. O rendimento do cultivo em meio líquido foi então comparado entre essas três linhagens.

Para isso, cada linhagem foi cultivada *overnight* em meio NB e diluída até uma DO_{600nm} igual a 1. Para cada linhagem, 50 μ L dessa amostra foram misturados com 10^3 UFP do fago em 5 mL de meio NB em tubos de 50 mL, que foram incubados a 30°C com agitação de 250 rpm por 24 h. Após centrifugação e filtração, os sobrenadantes dos cultivos foram diluídos serialmente e plaqueados para quantificação com Xac 306 como hospedeiro. Para cada linhagem, o experimento foi feito em triplicata.

3.9 Clonagem e expressão recombinante de proteínas do fago

Dois ORFs anotadas no genoma do fago foram escolhidas para clonagem e expressão recombinante: as ORFs LUCX_3 e LUCX_133. A ORF LUCX_3 foi anotada como proteína hipotética, mas uma análise preditiva no Interpro mostrou que ela deveria conter um domínio com atividade de lisozima. Já a ORF LUCX_133 foi anotada como *phage peptidoglycan hydrolase* e uma análise no Interpro mostrou que ela deveria conter dois domínios, um de ligação a peptidoglicano (N-terminal) e um catalítico, com atividade de N-acetilmuramidase (C-terminal). Foram selecionadas para clonagem três regiões: o domínio de lisozima da ORF LUCX_3, o domínio catalítico da ORF LUCX_133 e a ORF LUCX_133 inteira. Essas proteínas foram escolhidas por serem de interesse biotecnológico, já que poderiam ter ação bacteriolítica contra *X. citri*. As sequências codificantes das proteínas de interesse estão disponíveis no Anexo C.

Os *primers* F e R foram desenhados com sítios de restrição para as enzimas NdeI (CATATG) e XhoI (CTCGAG), respectivamente. A Tabela 2 mostra esses *primers* com os sítios de restrição em negrito. A PCR foi feita com o *Pfu DNA Polymerase Kit* (Cellco), de acordo com as recomendações do fabricante. Os produtos de PCR foram purificados por eletroforese em gel de agarose, ligados ao vetor pJET1.2/blunt com o *CloneJET PCR Cloning Kit* (Thermo Scientific) de acordo com as recomendações do fabricante e propagados em *E. coli* DH5 α . As construções foram digeridas com as enzimas de restrição mencionadas e o inserto foi subclonado no vetor pET28a para expressão em *E. coli* BL21(DE3). As células foram cultivadas em meio LB até o início da fase exponencial e a expressão foi induzida com IPTG 0,1 mM. As células foram coletadas por centrifugação e lisadas por sonicação. As proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de níquel e eluídas com um gradiente de imidazol (10 mM a 500 mM).

Tabela 2. *Primers* usados para amplificação das três sequências nucleotídicas de interesse

Proteína desejada	ORF	Primer F	Primer R
Domínio de lisozima	LUCX_3	CATATGAAGCCCTTGTT GATGCGG	CTCGAGTTACACGCTACGGTTG CC
Domínio catalítico	LUCX_133	CATATGGGTATGGTCCAT GCTCTGG	GCTCGAGTTAGACCTGATCAAA GTACTTCTTC
Proteína completa	LUCX_133	GCATATGTTGCTCAAAC GAACGATC	CTCGAGTTAGTACTGACCCTTG AC

3.10 Análise pangenômica

Das vinte e três linhagens de Xac, XauB e XauC usadas na determinação do espectro de hospedeiros, oito já haviam sido sequenciadas (Tabela 1). Dessas oito, sete são suscetíveis à infecção pelo fago e uma é resistente (ver o item 4.6). Pode-se supor que um ou mais genes essenciais para o ciclo de vida do fago, como por exemplo o gene do receptor celular, devam estar presentes em todas as linhagens suscetíveis mas ausentes na linhagem resistente.

Para determinar quais genes estão presentes nas linhagens suscetíveis e ausentes na resistente, os genomas (incluindo plasmídeos) dessas linhagens foram baixados do NCBI em formato GenBank e analisados no programa GET_HOMOLOGUES (CONTRERAS-MOREIRA; VINUESA, 2013). Primeiramente, os *scripts* “get_homologues.pl” e “compare_clusters.pl” foram usados para gerar uma matriz pangenômica, que indica quais genes do conjunto total de genes dessas linhagens (ou seja, seu pangenoma) estão presentes ou ausentes em cada linhagem. Em seguida, usando-se o *script* “parse_pangenome_matrix.pl”, a matriz gerada anteriormente foi analisada para se determinarem os genes conservados entre as sete linhagens suscetíveis e ausentes na linhagem resistente.

Usando-se o procedimento descrito acima, foram buscados inicialmente os genes presentes em todas as linhagens suscetíveis, mas depois a análise foi repetida permitindo-se que os genes estivessem ausentes em uma das sete. Embora menos precisa, essa abordagem se justifica porque o genoma da maioria das linhagens suscetíveis está fragmentado em *contigs*, ou seja, o sequenciamento não cobre o genoma todo, e os genes de interesse poderiam ocorrer justamente nos trechos faltantes.

As proteínas codificadas pelos genes encontrados por meio das análises descritas foram analisadas nos programas SignalP para predição de peptídeos-sinal (PETERSEN et al., 2011), TMHMM para predição de hélices transmembrana (KROGH et al., 2001) e LipoP para predição de lipoproteínas (JUNCKER et al., 2003). As proteínas também foram checadas no banco de dados Uniprot. Para visualização dos genomas foi utilizado o programa GView Server (PETKAU et al., 2010).

3.11 Teste de controle biológico

Esse teste foi conduzido por Talita Alves dos Santos, sob coordenação do Dr. Franklin Behlau (Fundecitrus, Araraquara – SP) para se avaliar o potencial do fago como um agente de controle biológico do cancro cítrico. O experimento foi feito duas vezes e os dados de cada uma das repetições são indicados nos resultados como “Réplica 1” e “Réplica 2”.

As plantas utilizadas foram da espécie laranja doce (*Citrus sinensis*), variedade Pera, mantidas em estufa com temperatura média de 31,2°C ao longo do experimento. As plantas foram cultivadas em vasos de 20 L contendo terra e um substrato orgânico (1:1) e foram podadas trinta dias antes do experimento para a obtenção de folhas homogêneas jovens em estágio V4, que é altamente suscetível à infecção pela bactéria (VILORIA et al., 2004).

Xac 306 foi cultivada como descrito anteriormente, centrifugada, diluída em uma solução de MgSO₄ 2,46 g/L em água deionizada, e diluída até uma DO_{600nm} igual a 0,3, correspondente a 10⁸ UFC/mL. A amostra foi então diluída para 10⁷ UFC/mL, concentração em que foi usada no experimento.

O fago foi propagado em meio NB com Xac 306 como hospedeiro. Em um *erlenmeyer* de 1 L contendo 300 mL de meio NB foram acrescentados 150 µL de uma amostra do fago contendo 10⁷ UFP/mL e 1,5 mL de um cultivo *overnight* de Xac 306 feito em NB. A amostra foi incubada *overnight* a 30°C sob agitação de 250 rpm. Após uma centrifugação de 20 min a 10.000 g, o sobrenadante foi coletado e armazenado a 4°C até o momento do uso. A amostra foi quantificada, o que indicou que ela estava a 10⁹ UFP/mL. As concentrações usadas no experimento foram três: a original, uma diluição 1:10 (10⁸ UFP/mL) e uma diluição 1:100 (10⁷ UFP/mL). As diluições foram feitas em água destilada.

O desenho experimental é mostrado na Tabela 3. Foram usados cinco grupos de plantas, cada uma contendo quatro plantas. No grupo controle positivo, as plantas somente foram aspergidas com Xac 306. No grupo controle negativo, as plantas foram aspergidas com um bactericida comercial à base de cobre (*Recop*, Albaugh) e com Xac 306 no dia seguinte. Nos grupos teste 1, 2 e 3, o bactericida foi substituído pelo fago, que foi aplicado nas concentrações indicadas acima. As plantas foram aspergidas nas faces adaxial e abaxial de suas folhas com um borrifador até o ponto de escorrimento e, após a aspersão de Xac 306, foram colocadas em uma câmara úmida por 24 h, favorecendo a abertura dos estômatos e, conseqüentemente, a penetração das bactérias (FERRAZ, 2020).

Tabela 3. Experimento de controle biológico

Grupos	Tratamentos aplicados	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Controle positivo	Só bactéria	-		
Controle negativo	<i>Recop</i> + bactéria	<i>Recop</i>	Xac 306 + colocação na câmara úmida	Retirada da câmara úmida
Teste 1	Fago 10 ⁹ UFP/mL + bactéria	Fago		
Teste 2	Fago 10 ⁸ UFP/mL + bactéria			
Teste 3	Fago 10 ⁷ UFP/mL + bactéria			

Trinta dias após a aplicação das bactérias, foram coletadas dez folhas de cada planta (previamente marcadas). Após a coleta, as folhas foram digitalizadas e sua área superficial foi calculada usando-se o programa ImageJ, enquanto que o número de lesões em cada folha foi contado visualmente. Na análise dos dados, as dez folhas de cada planta foram consideradas réplicas técnicas, usadas apenas para se obter uma medida de lesões/área para cada planta, e as quatro plantas de cada grupo experimental foram consideradas réplicas biológicas. Foi calculada a média de lesões por cm² entre as dez folhas de cada planta, desprezando-se *outliers*. Dessa forma, foi obtida uma medida de lesões/área para cada planta. Por fim, para cada grupo experimental, foram calculadas a média e o desvio-padrão dessas medidas, valores que foram então plotados graficamente para comparação entre os grupos.

4 Resultados

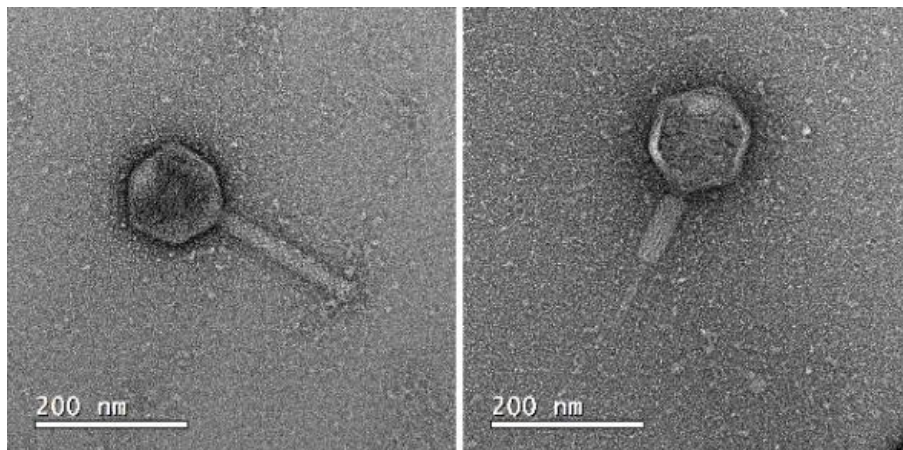
4.1 Isolamento e propagação de fagos

Usando-se os procedimentos descritos anteriormente foi possível isolar um fago de uma amostra de terra coletada em um pomar de citros acometido pelo cancro cítrico. O fago foi isolado com Xac 306 como hospedeiro e pode ser propagado em meio NB com essa mesma linhagem. A concentração tipicamente obtida nos cultivos em meio líquido com Xac 306 como hospedeiro foi de 10^9 UFP/mL. Quando plaqueado pelo método de dupla camada em NA semi-sólido (com ágar a 0,4%), o fago formou placas de lise de aproximadamente 0,7 mm. O tamanho das placas de lise permaneceu o mesmo alterando-se a concentração de ágar para 0,3%. O fago não pôde ser propagado em meio LB (*lysogeny broth*) ou em meio LB-ágar semi-sólido, embora Xac 306 possa ser cultivada nesses meios.

4.2 Microscopia eletrônica de transmissão

Imagens do fago obtidas por microscopia eletrônica são mostradas na Figura 5. O fago tem uma cabeça aparentemente icosaédrica e uma cauda contrátil, sem fibras definidas na base da cauda. Com a cauda estendida, seu comprimento é de cerca de 325 nm. Por possuir um genoma de dsDNA e uma cauda contrátil, o fago pode ser classificado na família Myoviridae da ordem Caudovirales (NOBREGA et al., 2018).

Figura 5. Microscopia eletrônica de transmissão do fago LucasX, mostrando sua cauda em conformação estendida (esq.) e retraída (dir.)



4.3 Sequenciamento, montagem e anotação do genoma

A montagem feita com o SPAdes usando-se 610 mil *reads* do arquivo R1 gerou um *contig* de 305.778 pb sem similaridade com o genoma de Xac 306 ou com outros genomas disponíveis no NCBI. A cobertura do sequenciamento desse *contig* foi de 237,7 vezes. A montagem também produziu outros quatro *contigs* menores que 4.000 pb e que podiam ser mapeados no genoma de Xac 306. Assumiu-se que o *contig* maior deveria corresponder ao genoma do fago. A análise feita no Bowtie2 com as *reads* usadas na montagem mostrou que 99,9% delas podiam ser mapeadas em uma única posição nesse *contig*, 0,1% não podiam ser mapeadas e nenhuma podia ser mapeada em mais de uma posição.

O *contig* apresentou repetições diretas de 127 pb em suas extremidades, sugerindo que o genoma havia sido sequenciado até a completude. Para se determinar se as extremidades do *contig* correspondiam às extremidades físicas do genoma, foi feita uma PCR usando-se *primers* que hibridizavam perto dessas extremidades e com suas terminações 3' voltadas para fora (resultado não mostrado). Como a PCR gerou um *amplicon* mesmo sem que o genoma fosse circularizado *in vitro*, concluiu-se que ele devia ser circular ou então linear e circularmente permutado com um comprimento de 305.651 pb removendo-se uma das repetições das extremidades.

O genoma do fago LucasX é mostrado na

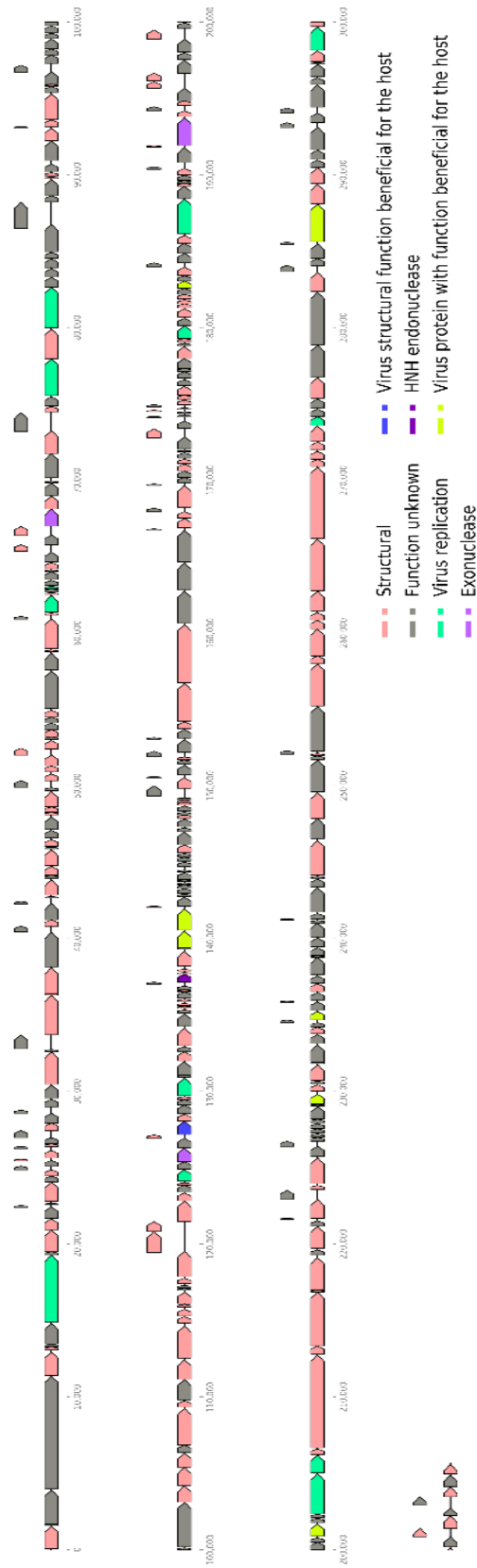
Figura 6 e a Tabela 4 mostra algumas de suas características. O conteúdo de GC do fago é de 54,9% enquanto que o de Xac 306 é de 64,8%. Foram encontrados cinco genes de tRNA e quarenta e sete terminadores Rho-independentes. Das trezentas e noventa e quatro ORFs identificadas pelo PHANOTATE, foram atribuídas funções a cento e oitenta e uma, enquanto que duzentas e treze permaneceram como hipotéticas. A análise com o DeepCapTail identificou cento e cinquenta e sete proteínas estruturais, o equivalente a 40% das ORFs. A análise de HMM identificou uma endonuclease HNH, sete proteínas classificadas como benéficas para o hospedeiro (categoria que inclui, por exemplo, genes de resistência a antibióticos e síntese de cofatores enzimáticos), doze com funções replicativas e uma proteína estrutural benéfica para o hospedeiro. Além disso, cento e quarenta e nove são genes novos, não identificados em nenhum outro genoma viral analisado.

O fago foi denominado vB_XciM_LucasX, seguindo-se o padrão de nomenclatura convencional para fagos (vB = *virus of Bacteria*, XciM = *X. citri* Myoviridae, seguido de um nome arbitrário para uso corrente) (KROPINSKI; PRANGISHVILI; LAVIGNE, 2009), e seu genoma anotado foi depositado no NCBI sob o *accession number* MW825358.1.

Tabela 4. Características do genoma do fago LucasX

Tamanho do genoma	305.651 pb
Cobertura do sequenciamento	237.7 x
% GC	54.92%
ORFs	394
Com função atribuída	181
Hipotéticas	213
Genes de tRNA	5 (2 Leu, Thr, Ser, Gln)
Terminadores Rho-independentes	47

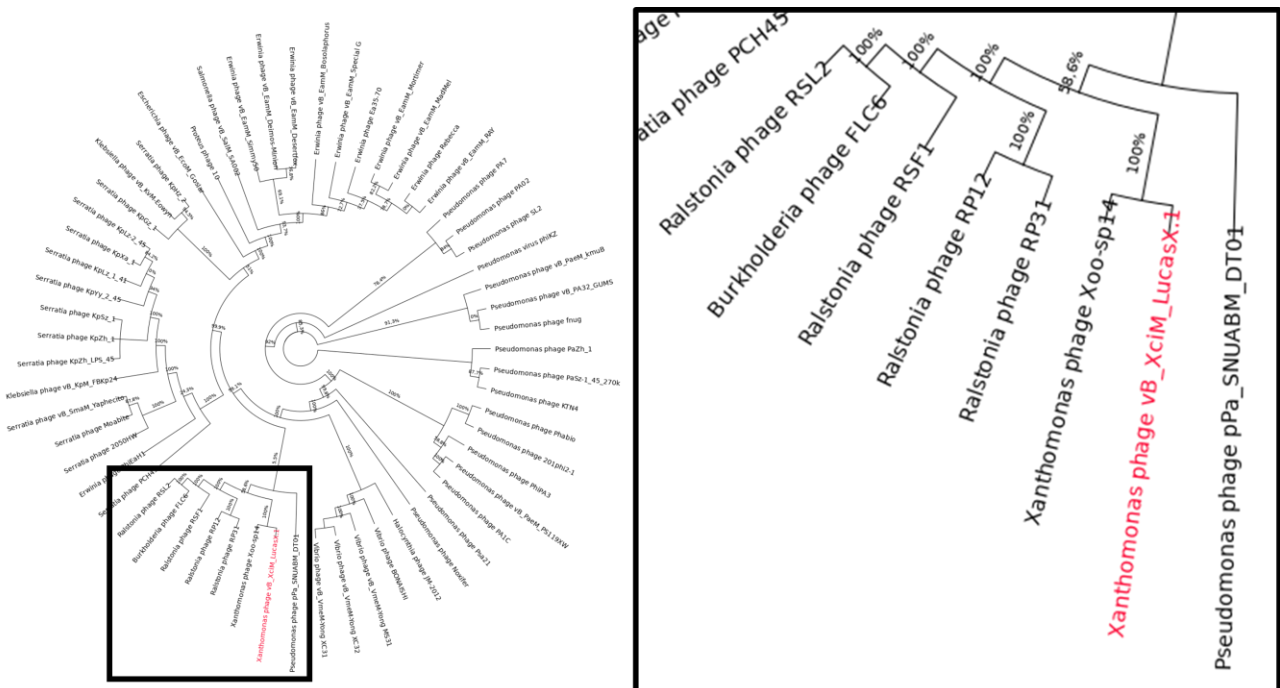
Figura 6. Genoma do fago LucasX, mostrando as ORFs anotadas



4.4 Filogenia

A análise ANI (*average nucleotide identity*) mostrou que o fago mais parecido com LucasX é o Xoo-sp14, um jumbo fago que infecta *X. oryzae* pv. *oryzae* (NAZIR et al., 2020), e com o qual LucasX tem 69% de similaridade nucleotídica. Xoo-sp14 é um fago com genoma de dsDNA, linear, com 232.104 pb, com um conteúdo de GC de 58% e para o qual foram anotados duzentos e cinquenta e um genes. A análise feita com o vContact2 colocou LucasX em um *cluster* contendo outros cinquenta e oito vírus indicando similaridade proteica e permitindo classificá-lo na família Myoviridae, corroborando a classificação sugerida pela microscopia eletrônica. Esses fagos foram recuperados e submetidos a uma nova análise de clusterização de proteínas, que mostrou que o fago com proteoma mais similar ao do LucasX era o Xoo-sp14. A **Erro! Fonte de referência não encontrada.** mostra a árvore de máxima verossimilhança obtida para esses fagos, mostrando, como esperado, que o fago Xoo-sp14 é o mais próximo ao LucasX.

Figura 7. Filogenia do fago LucasX

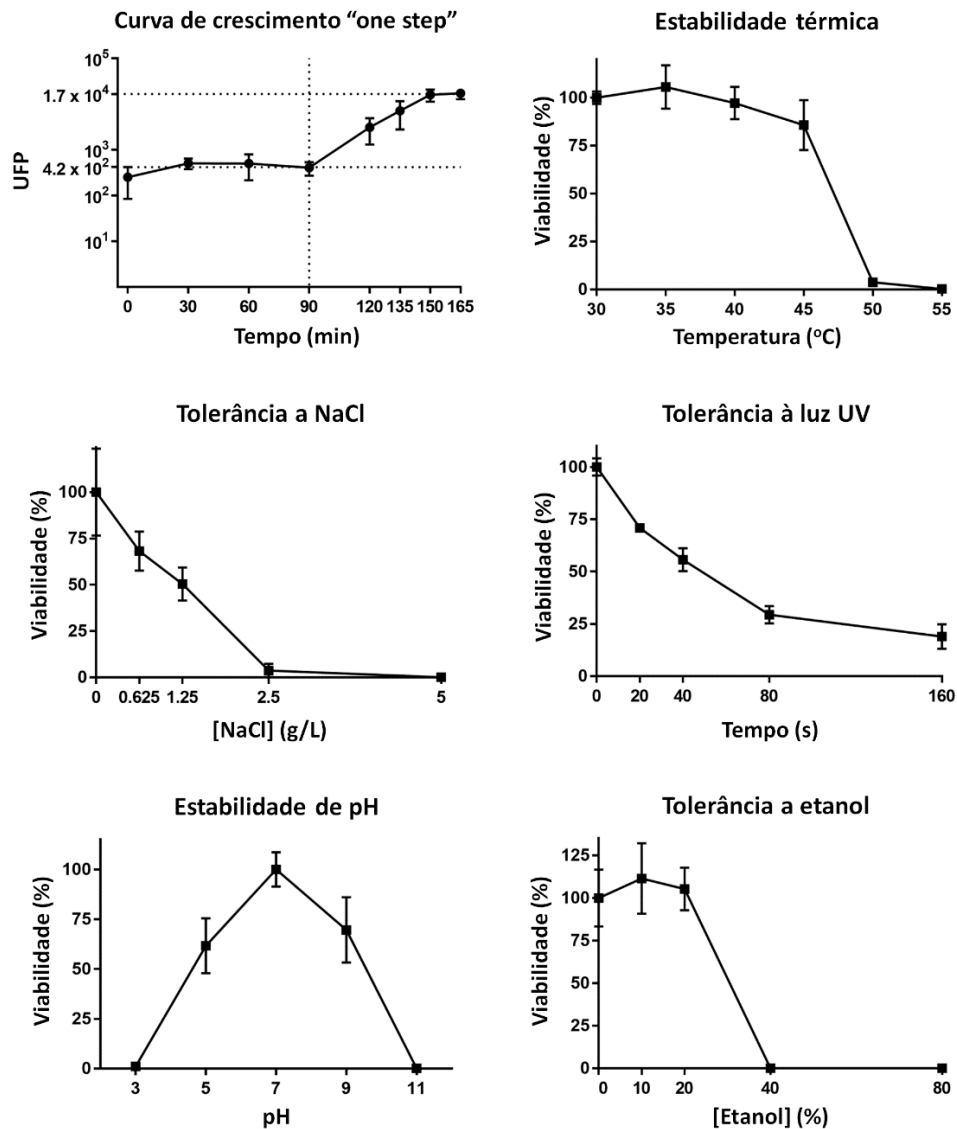


4.5 Curva de crescimento e estabilidade

O crescimento do fago LucasX e sua estabilidade em diferentes condições são mostrados na Figura 8. O fago apresenta um tempo de latência de aproximadamente 90 min e um *burst size* de aproximadamente 40 UFP/célula infectada quando Xac 306 é usada como hospedeiro.

A viabilidade do fago permanece acima de 80% em temperaturas de até 45°C mas cai bruscamente a partir de 50°C quando exposto a essas temperaturas por 30 min. LucasX apresentou uma baixa tolerância a NaCl, com uma redução aproximadamente linear em sua viabilidade de 100% para 0% em concentrações variando de 0 g/L a 2,5 g/L. Quando exposto à luz UV de uma cabine de segurança biológica, a viabilidade do fago decai em ritmo aparentemente exponencial, chegando a 20% do valor inicial após 160 s de exposição. A viabilidade do fago é máxima em pH 7, mas em pH 5 e 9, a viabilidade cai para 60% e 70%, respectivamente. Em pH 3 e 11, a viabilidade cai para 0%. Por fim, LucasX permanece estável em concentrações de etanol de até 20%, mas é completamente inativado a partir de 40%.

Figura 8. Crescimento e estabilidade do fago LucasX



4.6 Espectro de hospedeiros

Dentre as vinte e três linhagens de Xac, XauB e XauC testadas (listadas na Tabela 1), LucasX foi capaz de infectar vinte e uma. O fago infectou todas as catorze linhagens de Xac, todas as seis de XauC e uma das três de XauB. As únicas linhagens resistentes à infecção foram XauB 1565 e XauB 1566. O resultado foi o mesmo tanto no plaqueamento quanto no *spot test*. A Figura 9 mostra o resultado obtido no *spot test* com uma linhagem suscetível (XauB 11122) e uma resistente (XauB 1565), semelhante ao obtido com as demais linhagens. Em quase todas as linhagens suscetíveis, as placas de lise formadas pelo fago apresentaram o mesmo tamanho daquelas formadas quando Xac 306 é usada como hospedeiro. As únicas exceções foram as linhagens Xac 636 e XauC 752, que produziram placas de lise visivelmente maiores (ver item 4.7 Rendimento do fago em três linhagens hospedeiras)

Figura 9. *Spot test* de uma linhagem suscetível (XauB 11122) e uma resistente (XauB 1565)

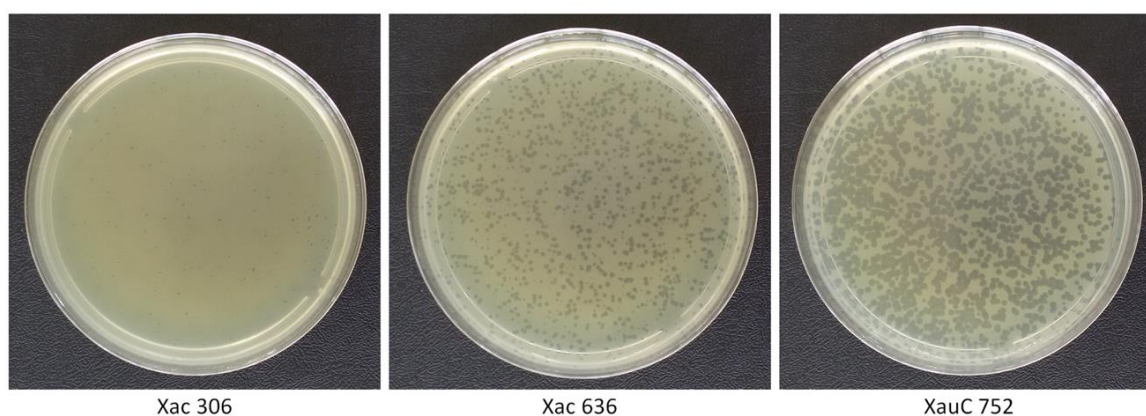


4.7 Rendimento do fago em três linhagens hospedeiras

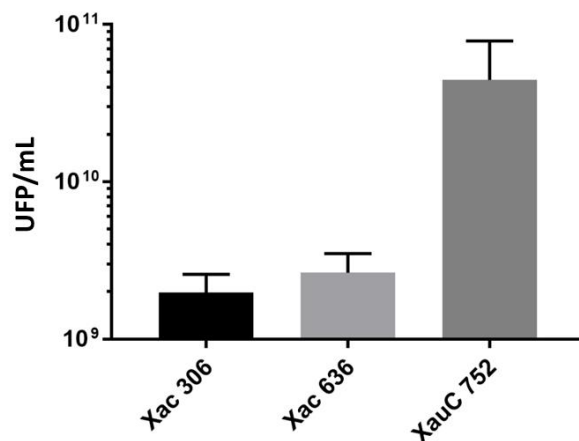
O plaqueamento do fago LucasX nas linhagens Xac 306, Xac 636 e XauC 752 é mostrado na Figura 120. As placas de lise são visivelmente maiores na linhagem Xac 636 (~1,4 mm) e maiores ainda na XauC 752 (~2,1mm), sugerindo que a propagação do fago nessas duas linhagens deveria

render mais fagos por unidade de volume do que na Xac 306. Em média, a propagação em meio NB (nas condições descritas no item 3.8 Rendimento do fago em três linhagens hospedeiras) usando-se como hospedeiros as linhagens Xac 306, Xac 636 e XauC 752 rendeu $1,99 \times 10^9$ UFP/mL, $2,64 \times 10^9$ UFP/mL e $4,44 \times 10^{10}$ UFP/mL, respectivamente (Figura 10).

Figura 10. Comparação entre o tamanho das placas de lise (acima) e o rendimento do fago no cultivo em meio líquido (abaixo) entre as linhagens Xac 306, Xac 636 e XauC 752



Rendimento do cultivo em três linhagens de *Xanthomonas* sp.



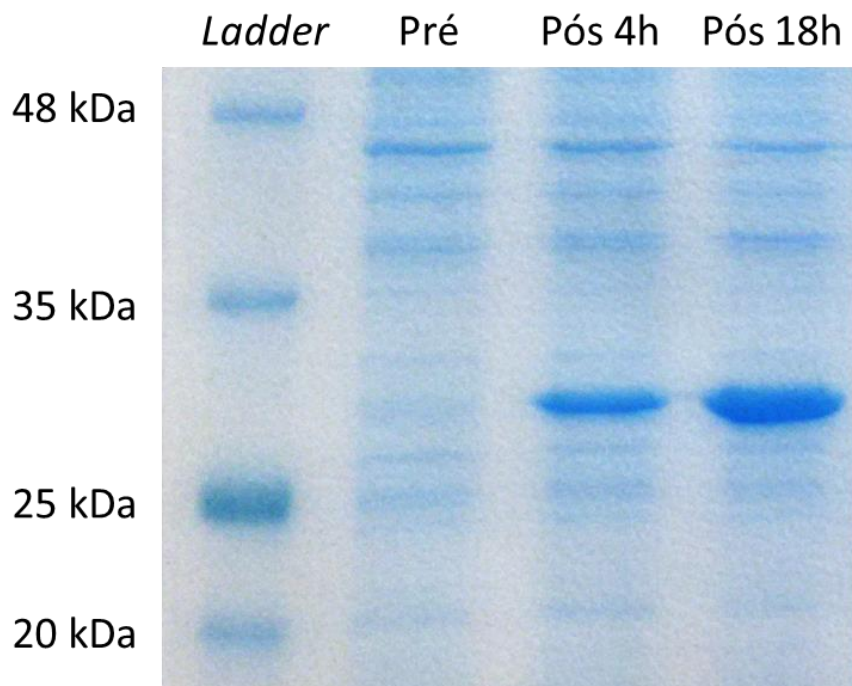
4.8 Clonagem e expressão recombinante de proteínas do fago

As sequências nucleotídicas codificadoras das três proteínas de interesse (o domínio de lisozima da ORF LUCX_3, o domínio catalítico da ORF LUCX_133 e a ORF LUCX_133 completa) foram amplificadas, clonadas no vetor de propagação pJET1.2/blunt e subclonadas no vetor pET28a para expressão recombinante em *E. coli*.

Entretanto, das três proteínas, apenas a proteína codificada pela ORF LUCX_133 completa pôde ser obtida. A massa molecular esperada para essa proteína era de 29,7 kDa. A Figura 11 mostra o SDS-PAGE com as proteínas totais da linhagem de expressão antes da indução com IPTG, 4 h após a indução e 18 h após a indução. Mesmo essa proteína, no entanto, não pôde ser obtida em alta concentração e apresentou baixa solubilidade. Todas as tentativas de aumentar sua solubilidade alterando-se o tampão de eluição (com acréscimo de glicerol, NaCl e Triton X-100) foram malsucedidas.

No caso das outras duas proteínas, o SDS-PAGE não indica a expressão de nenhuma proteína recombinante (resultado não mostrado), sugerindo que a proteína não estava sendo expressa, ao menos em níveis detectáveis por SDS-PAGE. Não foi possível, portanto, testar a atividade das proteínas de interesse.

Figura 11. SDS-PAGE das proteínas totais da linhagem de expressão da proteína codificada pela ORF LUCX_133 completa antes da indução com IPTG, após 4h de indução e após 18h de indução

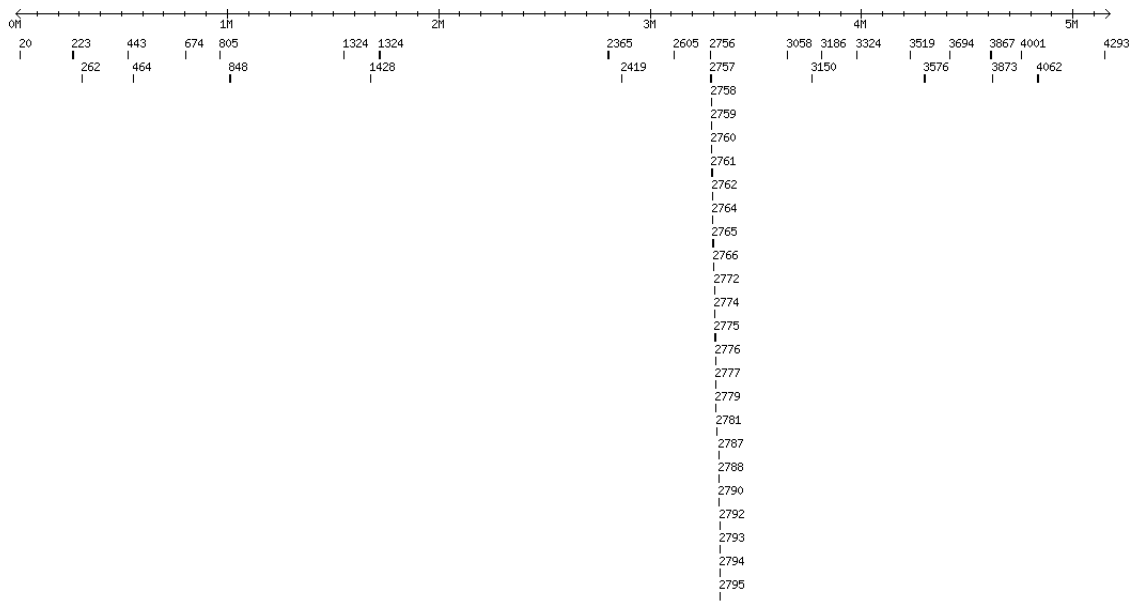


4.9 Análise pangenômica

A primeira análise feita com o GET_HOMOLOGUES apontou cinquenta genes conservados em todas as sete linhagens suscetíveis à infecção pelo fago LucasX e ausentes na linhagem XauB 1566, a única resistente à infecção. Desses cinquenta genes, um está localizado no plasmídeo pXac64,

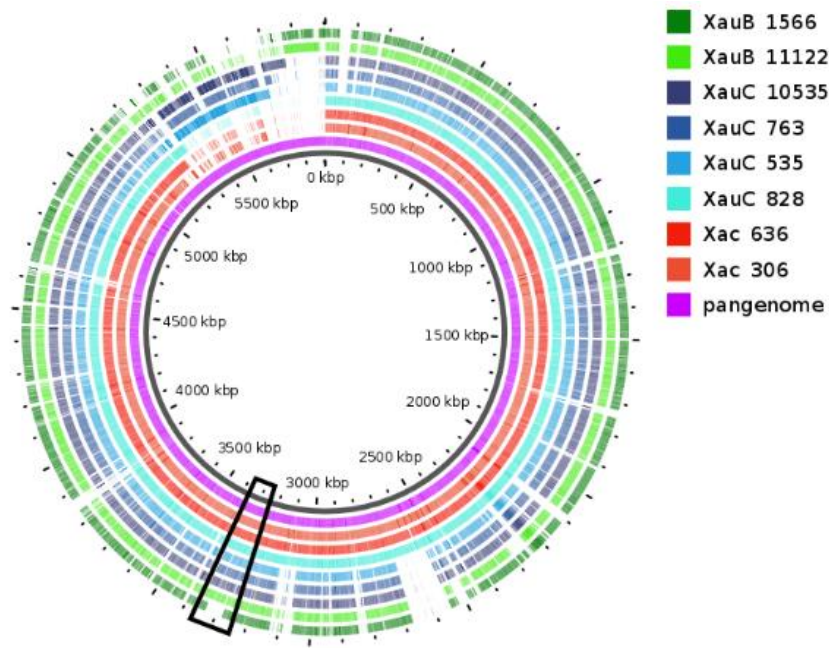
um dos dois plasmídeos endógenos de Xac 306, e os demais são cromossômicos. Dentre os genes cromossômicos, vinte e cinco estão dispersos pelo cromossomo e vinte e quatro se localizam em uma única região de aproximadamente 40 kpb, como mostrado na Figura 12. Essa região contém não apenas os vinte e quatro genes retornados pela análise, mas também outros, intercalados com os primeiros.

Figura 12. Genes conservados nas linhagens suscetíveis e ausentes na linhagem resistente mapeados no cromossomo de Xac 306



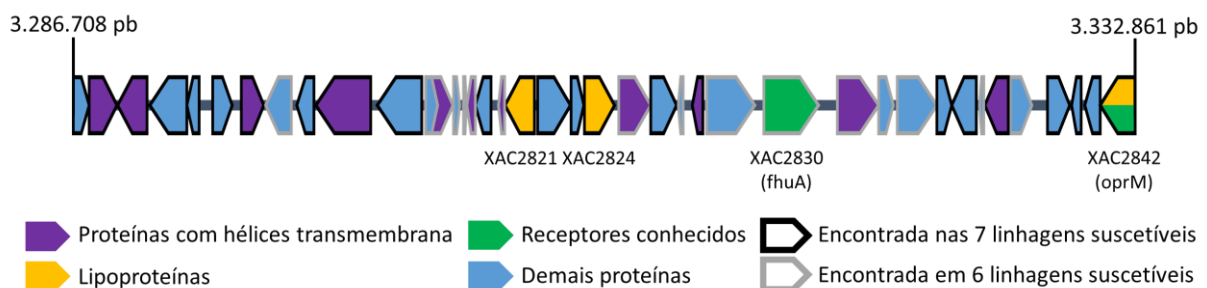
A segunda análise feita com o GET_HOMOLOGUES, permitindo que os genes buscados estivessem ausentes em uma das sete linhagens suscetíveis (mas ainda ausentes da linhagem resistente), retornou uma lista de genes mais extensa, alguns dos quais foram justamente os genes presentes na região de 40 kpb intercalados com aqueles retornados na primeira análise. No cromossomo de Xac 306, essa região se localiza entre as posições 3.286.708 pb e 3.332.861 pb. Uma busca por blast mostrou que essa região ocorre em todas as linhagens suscetíveis, mas não na linhagem resistente. A Figura 13 mostra a localização dessa região nos genomas analisados.

Figura 13. Alinhamento dos oito genomas analisados na pangenômica, com a região de 40 kpb em destaque



As análises preditivas e a consulta ao Uniprot mostraram que essa região deve codificar onze proteínas capazes de formar hélices transmembrana, três lipoproteínas (que ficam ancoradas na membrana externa por um grupo lipídico acrescentado como modificação pós-traducional) e duas proteínas que são sabidamente receptores de fagos em outras espécies de bactérias, sendo que uma dessas últimas é também uma lipoproteína. A Figura 14 mostra um esquema detalhado dessa região, indicando especialmente os genes de lipoproteínas e de receptores de fagos. Quanto às proteínas codificadas pelos vinte e seis genes candidatos dispersos pelo genoma de Xac 306 (ou seja, fora da região de 40 kpb), seis delas devem formar hélices transmembrana e três devem ser lipoproteínas.

Figura 14. Organização da região de 40 kpb no cromossomo de Xac 306



4.10 Teste de controle biológico

Os resultados do teste de controle biológico são mostrados em duas formas diferentes na Figura 15, sendo a primeira a severidade da infecção e a segunda, a eficiência do fago em controlar a infecção (em relação ao controle positivo).

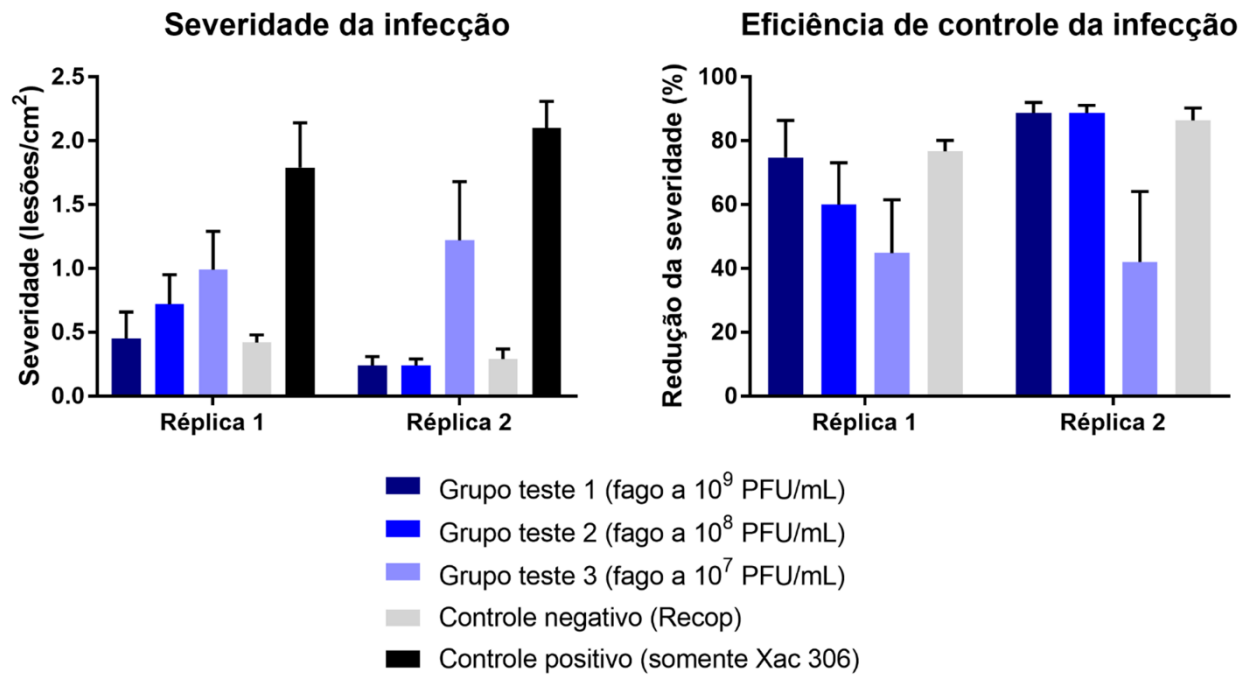
Na réplica 1, a severidade média da infecção, medida em número de lesões por cm^2 , foi de 1,79 no controle positivo (plantas infectadas com Xac 306) e de 0,42 no controle negativo (plantas infectadas com Xac 306, mas aspergidas previamente com o bactericida *Recop*). Nos grupos teste (plantas infectadas, mas aspergidas previamente com o fago LucasX em várias concentrações), a severidade variou de 0,99 (grupo teste 3, com fagos a 10^7 UFP/mL) até 0,45 (grupo teste 1, com fagos a 10^9 UFP/mL), valor muito próximo ao do controle negativo.

Na réplica 2, a severidade da infecção no controle positivo foi de 2,10 e no controle negativo, 0,29, enquanto que nos grupos teste, a severidade variou de 1,22 (grupo teste 3, com fagos a 10^7 UFP/mL) a 0,24 (grupo teste 1, com fagos a 10^9 UFP/mL), valor próximo ao do controle negativo nessa réplica. Nessa réplica do experimento, os grupos teste 1 e 2 apresentaram valores semelhantes.

Tomando o valor do grupo controle positivo como referência, a eficiência dos tratamentos na réplica 1 variou de 45% (grupo teste 3, com fagos a 10^7 UFP/mL) até 75% (grupo teste 1, com fagos a 10^9 UFP/mL), valor próximo aos 77% do controle negativo. A eficiência do fago variou de forma aproximadamente linear com a ordem de grandeza da concentração utilizada, tendo sido mais alta na maior concentração.

Na réplica 2, a eficiência dos tratamentos variou de 42% (grupos teste 3, com fagos a 10^7 UFP/mL) a 89% (grupos teste 1 e 2, com fagos a 10^9 e 10^8 UFP/mL, respectivamente), valor levemente superior aos 86% do controle negativo.

Figura 15. Resultado do teste de controle biológico com o fago LucasX



5 Discussão

Neste trabalho foi possível isolar um novo jumbo fago da família Myoviridae a partir de uma amostra de terra de um pomar de citros acometido pelo cancro cítrico, o qual foi denominado vB_XciM_LucasX. Até onde foi possível averiguar, este é o primeiro relato de um fago de *X. citri* isolado no Brasil.

Inicialmente, o isolamento foi tentado com amostras de solo coletadas em locais não acometidos pelo cancro. Embora o isolamento de fagos de *Xanthomonas* a partir de amostras coletadas em pomares saudáveis já tenha sido relatado na literatura, as tentativas com essas amostras não foram bem-sucedidas. O isolamento também foi tentado misturando-se as amostras de solo com meio NB e filtrando-se as amostras antes de inoculá-las com Xac 306, o que também não permitiu o isolamento de fagos. O fago LucasX só foi isolado misturando-se a amostra de solo com meio NB e inoculando-se Xac 306 sem filtração prévia, conforme o procedimento descrito por YOSHIKAWA et al. (2018). Além disso, o mesmo procedimento não permitiu o isolamento de fagos quando o meio LB foi usado no lugar do meio NB.

Esses resultados mostram a importância de se usarem diferentes estratégias no isolamento de fagos, especialmente quando são usadas amostras ainda não exploradas. Fagos que infectam o gênero *Xanthomonas* são tipicamente isolados de amostras de terra, folhas e frutos infectados (NAKAYINGA et al., 2021), mas fagos já foram isolados de ambientes bastante incomuns: DI LALLO et al. (2014) isolaram o fago Φ PSA2, cujo hospedeiro causa o cancro bacteriano do kiwi, a partir de uma amostra de esgoto municipal, enquanto CLAVIJO-COPPENS et al. (2021) relataram que fagos capazes de infectar *Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas albilineans*, que são fitopatógenos, foram isolados de águas superficiais e de esgoto, mas não de plantas infectadas por essas bactérias.

Após isolar LucasX em meio NB, não foi possível propagá-lo em meio LB. Como o LB tem uma concentração de NaCl mais alta que o meio NB, foi avaliada a sobrevivência de LucasX em meio NA semi-sólido com concentrações crescentes de NaCl. Como esperado, a sobrevivência do fago diminuiu à medida que a concentração de NaCl foi aumentada. Com 2,5 g/L de NaCl, que corresponde à metade da concentração de NaCl no meio LB, o crescimento do fago foi quase completamente inibido.

Esses resultados destacam a importância de se explorarem diferentes meios de cultura para o isolamento de novos fagos, uma vez que sua tolerância a NaCl e outros sais pode variar drasticamente

daquelas habitualmente relatadas na literatura. Fagos são tipicamente diluídos e armazenados em tampão SM (*saline-magnesium*), que contém 5,8 g/L de NaCl (MANOHAR et al., 2018; NARR et al., 2017) e uma concentração de NaCl de 1 M (58,44 g/L) já foi usada para o isolamento de fagos de *Klebsiella* de sedimentos aquáticos (ZURABOV; ZHILENKOV, 2021). KORF et al. (2020) relataram que cinco fagos dentre os que estavam estudando permaneceram estáveis por seis semanas em PBS (*phosphate-buffered saline*), PBS com 0,1 g/L NaCl, PBS com 5 g/L NaCl e em LB, sem diferença de viabilidade entre essas quatro condições.

LucasX tem um genoma de dsDNA com um tamanho de 305.651 pb, que provavelmente é linear e circularmente permutado. A predição de ORFs usando o PHANOTATE resultou em um número maior de ORFs do que o anotado pelo RASTtk. Com base nos resultados de HMM e DeepCapTail, mostrou-se que o genoma de LucasX codifica muitas proteínas relacionadas à transcrição e replicação do DNA, incluindo cinco RNA polimerases (LUCX_9, LUCX_73, LUCX_76, LUCX_94, LUCX_95). O genoma também deve codificar várias enzimas relacionadas ao metabolismo de nucleotídeos, como timidina quinase (LUCX_147), timidilato sintase (LUCX_157), desoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolase (LUCX_248), ribonucleosídeo-difosfato redutase 1, subunidades alfa e beta (LUCX_288 e LUCX_289), e diidrofolato redutase (LUCX_323).

Outra ORF notável encontrada no genoma de LucasX é LUCX_291, que foi anotada como uma proteína de agente de transferência de genes. Os agentes de transferência de genes (*gene transfer agents* ou GTA) são elementos semelhantes a fagos que podem formar capsídeos nos quais pedaços aleatórios de seu genoma de origem podem ser empacotados e transferidos horizontalmente (LANG; ZHAXYBAYEVA; BEATTY, 2012). Uma análise do InterPro com a proteína codificada por esta ORF indica a presença de um domínio de glicosídeo hidrolase que também está presente no GTA da bactéria *Rhodobacter capsulatus*, o primeiro organismo em que um GTA foi identificado (SOLIOZ; MARRS, 1977). Não foram identificadas outras proteínas de GTA em LucasX e não se conhece a relevância evolutiva dessa proteína para o fago.

A morfologia de LucasX é típica da família Myoviridae, com uma cabeça aparentemente icosaédrica de 125 nm e uma cauda contrátil de aproximadamente 200 nm. A bainha da cauda pôde ser observada tanto em conformação estendida quanto em conformação contraída. Quando contraída, a bainha é reduzida a aproximadamente metade de seu comprimento estendido. O fago não apresentou uma *baseplate* ou espículas visíveis. A maioria dos autores relata o uso de vários métodos de purificação antes da microscopia, geralmente por precipitação com PEG seguida de purificação por centrifugação em um gradiente de CsCl (AJUEBOR et al., 2018; YANG et al., 2020). Entretanto foi

possível obter boas micrografias usando fagos de lisados celulares que haviam sido apenas filtrados. Além disso, embora as amostras preparadas para microscopia não sejam biologicamente ativas e geralmente venham de uma amostra pura, recomenda-se não manipulá-las excessivamente para evitar que as propriedades dos fagos sejam alteradas (CARROLL-PORTILLO et al., 2021).

O genoma de LucasX tem cerca de cento e cinquenta e sete genes que devem codificar proteínas estruturais, como proteínas do capsídeo e da cauda e proteínas associadas à montagem de fagos, conforme ilustrado na

Figura 6. No entanto, para a maioria das proteínas estruturais não foi possível atribuir funções específicas, e essas foram então anotadas como “proteína estrutural do vírion”. As exceções são LUCX_16 e LUCX_54, que foram anotados como chaperona putativa e proteína semelhante à tubulina do fago, respectivamente.

Muitos autores constroem árvores filogenéticas para fagos usando genes/proteínas específicas, como a proteína principal do capsídeo, terminases ou RNA polimerase (KWON et al., 2021; YANG et al., 2020; YOSHIKAWA et al., 2018). Como LucasX não apresenta um alto grau de semelhança com outros fagos, foram usados os quatro agrupamentos de proteínas que foram identificados na análise de clusterização. A árvore gerada pelo FastTree indica que LucasX é mais relacionado ao fago Xoo-sp14 do que aos outros fagos da análise. O grupo no qual LucasX é encontrado também inclui fagos que infectam *Ralstonia* (fagos RSF1, RSL2, RP12 e RP31), *Burkholderia* (fago FLC6) e *Pseudomonas* (fago pPa_SNUABM_DT01).

LucasX tem um amplo espectro de hospedeiros entre linhagens de *Xanthomonas*, infectando vinte e uma das vinte e três linhagens testadas. O fago XacN1, um jumbo fago que infecta *X. citri*, foi testado contra dez linhagens, nove das quais se mostraram suscetíveis (YOSHIKAWA et al., 2018). LucasX infectou todas as linhagens de Xac e XauC e também uma das três linhagens de XauB testadas. Xac causa a forma mais grave de cancro cítrico e é o patótipo mais comum, enquanto XauB é encontrado apenas na Argentina e é mais agressivo em limão e menos agressivo em laranja doce, tangerina e *grapefruit* (BEHLAU; GOCHEZ; JONES, 2020).

O tempo de latência e o *burst size* do fago LucasX foram de 90 min e 40 UFP/célula infectada, respectivamente. Esses parâmetros podem variar bastante entre fagos que infectam bactérias do gênero *Xanthomonas*: já foram reportados tempos de latência variando de 20 min a 210 min e *burst sizes* variando de 4,6 UFP/célula a 350 UFP/célula (NAKAYINGA et al., 2021). Os fagos Cp1 e Cp2, usados para tipagem de linhagens de *X. citri*, apresentam tempos de latência de 60 min e 90 min, respectivamente, e *burst sizes* de 20 UFP/célula e 100 UFP/célula, respectivamente (AHMAD et al.,

2014). Já o fago XacN1 apresenta um tempo de latência e um *burst size* de 60 min e 30 UFP/célula, respectivamente (YOSHIKAWA et al., 2018).

LucasX permanece viável até a 45°C, mas sua viabilidade cai drasticamente quando a temperatura é aumentada para 50°C. Quanto à estabilidade de pH, LucasX permanece pelo menos 60% viável em uma faixa de pH de 5 a 9, com um pH ótimo de 7. Além disso, sua viabilidade também diminui quando exposto à luz UV de uma lâmpada germicida.

Embora ter uma ampla gama de hospedeiros possa ser vantajoso, a suscetibilidade a altas temperaturas e luz UV pode ser prejudicial para o uso do fago para controle biológico (JONES et al., 2012). Já foram propostas estratégias para superar essas limitações, como incluir leite desnatado e sacarose na formulação do fago ou aplicar os fagos à noite para reduzir a exposição à luz solar (BALOGH et al., 2003; IRIARTE et al., 2007; GAŠIĆ et al., 2018). No entanto, a resistência do fago LucasX à luz UV foi avaliada em ambiente artificial, com exposição direta a uma lâmpada UV e, portanto, uma menor sensibilidade pode ser esperada no caso de exposição à luz solar em campo. Também foi mostrado que LucasX pode ser inativado em etanol 40%. Esses resultados mostram que o fago LucasX pode ser inativado usando-se recursos comuns em laboratórios de pesquisa, o que é um aspecto de biossegurança relevante.

As placas de lise formadas por LucasX usando-se Xac 306 como hospedeiro tem tamanho pequeno (~0,7 mm) e reduzindo-se a concentração do ágar no meio semi-sólido de 0,4% para 0,3%, não são obtidas placas maiores. Esse comportamento é diferente do observado para o fago XacN1, cujas placas de lise apresentaram tamanho maior (1-2 mm) ao se reduzir a concentração de ágar de 0,45% para 0,3% (YOSHIKAWA et al., 2018).

Após a observação casual de que LucasX produz placas maiores quando plaqueado usando-se as linhagens Xac 636 e XauC 752 como hospedeiros, foi testada a hipótese de que a propagação nessas linhagens deveria render mais fagos por volume do que na linhagem Xac 306. O rendimento foi apenas ligeiramente maior na linhagem Xac 636, mas uma ordem de grandeza maior em XauC 752. Embora este resultado não forneça uma forte evidência de uma relação direta entre o tamanho das placas de lise e o rendimento da propagação em meio líquido, ele mostra que melhorias no rendimento podem ser obtidas apenas trocando-se a linhagem hospedeira. A produção em massa de fagos é considerada um dos maiores desafios para a popularização do uso de fagos como agentes antibacterianos (GARCÍA et al., 2019; JURÁČ; NABERGOJ; PODGORNIK, 2019). Já foram relatadas diferentes estratégias para aumentar o rendimento de cultivos de fagos, como otimizar a MOI inicial e o inóculo bacteriano (KIM et al., 2021) ou usar biorreatores em diferentes arranjos

(MANCUSO; SHI; MALIK, 2018; SAUVAGEAU; COOPER, 2010). Entretanto, até onde foi possível averiguar, não há na literatura artigos descrevendo melhorias no rendimento pela busca de linhagens bacterianas de alta produtividade.

Das três proteínas escolhidas para expressão recombinante, apenas a proteína codificada pela ORF LUCX_133 completa pôde ser expressa, mas essa proteína se mostrou insolúvel e não pôde ser obtida em grande quantidade, impossibilitando estudos de atividade. As outras duas proteínas de interesse, o domínio de lisozima da ORF LUCX_3 e o domínio catalítico da ORF LUCX_133, sequer foram expressas, com base no SDS-PAGE com as proteínas das linhagens de expressão. O motivo disso não é conhecido, mas é possível supor que essas proteínas sejam tóxicas para *E. coli*, o que sugere que elas de fato tenham ação bacteriolítica. Essas proteínas continuam sendo de interesse para futuros estudos e uma alternativa para obtê-las seria tentar expressá-las em um hospedeiro não bacteriano, como *Pichia pastoris*, ou em um sistema de expressão do tipo *cell-free*.

Para prever se uma determinada linhagem de bactéria (pertencente ou não ao gênero *Xanthomonas*) deverá ser suscetível à infecção pelo fago LucasX, seria interessante determinar seu receptor viral, ou seja, o componente de superfície que permite a adesão do fago às células hospedeiras. Para isso, muitos autores utilizam o nocaute gênico aleatório com transposons, que consiste em transformar uma linhagem suscetível ao fago de interesse com um transposon previamente ligado à sua transposase, que irá então inseri-lo em um local aleatório do genoma. As células devem ser então triadas para se determinarem aquelas que se tornaram resistentes ao fago, indicando que o transposon comprometeu algum gene essencial para a infecção viral. Embora já usada com sucesso (COWLEY et al., 2018; KORTRIGHT; CHAN; TURNER, 2020), essa abordagem é bastante trabalhosa pois exige que muitos clones sejam avaliados e também que se determine posteriormente o local de inserção do transposon.

Para tentar identificar o gene do receptor do fago LucasX, utilizamos uma abordagem alternativa. Dentre as linhagens usadas para se determinar o espectro de hospedeiros do fago, oito tinham genoma já sequenciado, das quais sete eram suscetíveis e uma era resistente à infecção. A comparação entre os genomas dessas linhagens com o GET_HOMOLOGUES retornou uma lista de cinquenta genes conservados nas sete suscetíveis e ausentes na resistente. Essa lista de genes deve incluir genes essenciais para a infecção pelo fago, possivelmente o gene do receptor celular. Caso o receptor seja uma proteína, esta deve se localizar na superfície celular, por isso o maior interesse em lipoproteínas e em proteínas que possam formar hélices transmembrana. Receptores de fagos em bactérias Gram-negativas incluem não apenas proteínas de superfície, mas também carboidratos (BERTOZZI SILVA; STORMS; SAUVAGEAU, 2016). Entretanto, mesmo que o receptor seja um

carboidrato, sua estrutura deve ser determinada por ação enzimática, o que justifica que se analisem os genes em que as linhagens suscetíveis e a resistente diferem.

O resultado mais notável da análise conduzida é a observação de que, dos cinquenta genes candidatos, cerca de metade ocorrem em uma região com apenas alguns genes intercalados entre eles. Além disso, ao se afrouxar a análise do GET_HOMOLOGUES, permitindo que os genes buscados estejam ausentes em uma das linhagens suscetíveis, esses genes intercalados também são retornados, ou seja, a análise retorna todos os genes dessa região. Uma busca por blast mostrou que essa região é conservada em todas as linhagens suscetíveis, mas está ausente na linhagem resistente. Ele contém cerca de 40 kpb e quarenta genes no total, incluindo alguns que devem codificar proteínas de membrana externa. Além disso, dois desses genes codificam receptores de fagos conhecidos: a proteína OprM (*outer membrane porin M*) é o receptor do fago OMKO1 em *Pseudomonas aeruginosa* (CHAN et al., 2016) e a proteína FhuA (*ferrichrome outer membrane transporter*) é o receptor dos fagos T1, T5, phi80 e UC-1 em *E. coli* (BRAUN, 2009). Mais estudos serão necessários para elucidar o significado evolutivo dessa região, mas há uma grande chance de que ela contenha o gene do receptor do fago LucasX ou ao menos um ou mais genes essenciais para a infecção pelo fago.

Por fim, no experimento de controle biológico, a aspersão com o fago LucasX conseguiu inibir a infecção por Xac 306 em até 75-89% (dependendo da réplica), valor próximo ao do bactericida cúprico *Recop*, usado como controle negativo. Esses valores foram obtidos nos grupos experimentais em que o fago foi usado na concentração mais alta, mas mesmo na concentração mais baixa, as inibições foram de pelo menos 42-44% (dependendo da réplica). As concentrações do fago usadas nesse experimento foram baseadas na concentração recomendada para o *AgriPhage*, o primeiro pesticida à base de fagos aprovado para uso comercial nos EUA. O produto é vendido em concentração de aproximadamente 10^9 UFP/mL e o fabricante recomenda diluições de aproximadamente 10^7 UFP/mL (OMNILYTICS, [s.d.]). As concentrações usadas no experimento foram de 10^7 UFP/mL, 10^8 UFP/mL e 10^9 UFP/mL, com diluição em água destilada e, exceto pelo grupo teste 2 na réplica 2, o percentual de inibição dos tratamentos acompanhou de forma aproximadamente linear a ordem de grandeza desses valores. É razoável, portanto, imaginar que concentrações mais altas ou formulações otimizadas possam produzir resultados ainda melhores. Em futuros experimentos, seria desejável analisar também outros parâmetros, como o tempo máximo que pode ser adotado entre a aplicação dos fagos e da bactéria e a possibilidade de se diluir o fago em água comum. Além disso, o experimento conduzido avaliou o potencial profilático do fago LucasX, já que a aplicação dos fagos ocorreu antes da aplicação da bactéria. No futuro, seria interessante

avaliar também o potencial curativo do fago LucasX, testando-se a aplicação dos fagos após a aplicação da bactéria e o desenvolvimento do cancro nas plantas.

6 Conclusões

Neste trabalho de doutorado foi possível isolar e caracterizar um jumbo fago lítico da bactéria *X. citri*, pertencente à família Myoviridae e que foi denominado vB_XciM_LucasX. LucasX tem um amplo espectro de hospedeiros entre linhagens de Xac, XauB e XauC, não tendo infectado apenas duas das linhagens de XauB testadas. Comparando-se as linhagens que possuem genoma sequenciado, foi possível identificar uma região de 40 kpb de genes presente nas suscetíveis, mas não nas resistentes. LucasX pode ser propagado em meio NB, mas não em LB, provavelmente devido a sua baixa tolerância a NaCl. O rendimento de seu cultivo em meio líquido pode ser aumentado em uma ordem de grandeza ao se trocar a linhagem hospedeira. Por fim, LucasX mostrou potencial para ser utilizado como um agente de controle biológico do cancro cítrico.

7 Referências

- ABEDON, S. T. et al. Bacteriophage prehistory: Is or is not Hankin, 1896, a phage reference? **Bacteriophage**, v. 1, n. 3, p. 174–178, 2011.
- ABID, D.; ZHANG, L. **DeepCapTail: A Deep Learning Framework to Predict Capsid and Tail Proteins of Phage Genomes** bioRxiv, 23 nov. 2018. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/477885v1>>. Acesso em: 30 ago. 2021
- ACKERMANN, H.-W. Basic Phage Electron Microscopy. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [s.l: s.n.]. v. 501p. 113–126.
- AHERN, S. J. et al. Characterization of novel virulent broad-host-range phages of *Xylella fastidiosa* and *Xanthomonas*. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 2, p. 459–471, jan. 2014.
- AHMAD, A. A. et al. Characterization of bacteriophages cp1 and cp2, the strain-typing agents for *xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 77–85, 1 jan. 2014.
- AHMAD, A. A. et al. Dynamic integration and excision of filamentous phage XacF1 in *Xanthomonas citri* pv. *citri*, the causative agent of citrus canker disease. **FEBS Open Bio**, v. 7, n. 11, p. 1715–1721, nov. 2017.
- AJUEBOR, J. et al. Comparison of Staphylococcus phage K with close phage relatives commonly employed in phage therapeutics. **Antibiotics**, v. 7, n. 2, p. 37, 25 abr. 2018.
- Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data**. Disponível em: <<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>. Acesso em: 14 jun. 2021.
- BAE, J. Y. et al. Biocontrol potential of a lytic bacteriophage PE204 against bacterial wilt of tomato. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 12, p. 1613–1620, dez. 2012.
- BALOGH, B. et al. Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato. **Plant Disease**, v. 87, n. 8, p. 949–954, 1 ago. 2003.
- BALOGH, B. et al. Control of Citrus Canker and Citrus Bacterial Spot with Bacteriophages. **Plant Disease**, v. 92, n. 7, p. 1048–1052, 2008.
- BANKEVICH, A. et al. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-

- cell sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455–477, maio 2012.
- BARR, J. J. et al. Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 26, p. 10771–10776, 25 jun. 2013.
- BEHLAU, F.; GOCHEZ, A. M.; JONES, J. B. Diversity and copper resistance of *Xanthomonas* affecting citrus. **Tropical Plant Pathology**, v. 45, n. 3, p. 200–212, 31 mar. 2020.
- BERTOZZI SILVA, J.; STORMS, Z.; SAUVAGEAU, D. Host receptors for bacteriophage adsorption. **FEMS microbiology letters**, v. 363, n. 4, fev. 2016.
- BHUNCHOTH, A. et al. Isolation of *Ralstonia solanacearum*-infecting bacteriophages from tomato fields in Chiang Mai, Thailand, and their experimental use as biocontrol agents. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 4, p. 1023–1033, 2015.
- BOLDUC, B. et al. vConTACT: An iVirus tool to classify double-stranded DNA viruses that infect Archaea and Bacteria. **PeerJ**, v. 2017, n. 5, 2017.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 1 ago. 2014.
- BOYACIOGLU, O. et al. Biocontrol of *Escherichia coli* O157: H7 on fresh-cut leafy greens. **Bacteriophage**, v. 3, n. 1, p. e24620, 1 jan. 2013.
- BRAUN, V. FhuA (TonA), the career of a protein. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 11, p. 3431–3436, 2009.
- BRETTIN, T. et al. RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, 2015.
- BROWN, D. R. et al. The Xp10 Bacteriophage Protein P7 Inhibits Transcription by the Major and Major Variant Forms of the Host RNA Polymerase via a Common Mechanism. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n. 20, p. 3911–3919, 9 out. 2016.
- BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, n. 3, p. 141–157, 1 maio 2003.
- BUSHNELL, B. **BBTools - DOE Joint Genome Institute**. Disponível em: <<https://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools/>>. Acesso em: 14 jun. 2021.
- CANTEROS, B. I. Management of citrus Canker in Argentina. A Review. **Proceedings**

International Society Citriculture, v. 33, n. 90, p. 1–19, 2004.

CARROLL-PORTILLO, A. et al. Standard bacteriophage purification procedures cause loss in numbers and activity. **Viruses**, v. 13, n. 2, 1 fev. 2021.

CASERTA, R. et al. Expression of *Xylella fastidiosa* RpfF in Citrus Disrupts Signaling in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and Thereby Its Virulence. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 27, n. 11, p. 1241–1252, 2014.

CHAE, J.-C. et al. Diversity of bacteriophages infecting *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in paddy fields and its potential to control bacterial leaf blight of rice. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 740–7, 28 jun. 2014.

CHAN, B. K. et al. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. **Scientific Reports**, n. May, p. 1–8, 2016.

CLAVIJO-COPPENS, F. et al. Novel virulent bacteriophages infecting mediterranean isolates of the plant pest *xylella fastidiosa* and *xanthomonas albilineans*. **Viruses**, v. 13, n. 5, 1 maio 2021.

CLOKIE, M. R. J. et al. Phages in nature. **Bacteriophage**, v. 1, n. 1, p. 31–45, 2011.

CONTRERAS-MOREIRA, B.; VINUESA, P. GET_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 24, p. 7696–7701, dez. 2013.

COWLEY, L. A. et al. Transposon Insertion Sequencing Elucidates Novel Gene Involvement in Susceptibility and Resistance to Phages T4 and T7 in *Escherichia coli* O157. **mBio**, v. 9, n. 4, p. e00705-18, 24 jul. 2018.

CZAJKOWSKI, R. et al. Genomic, proteomic and morphological characterization of two novel broad host lytic bacteriophages Φ PD10.3 and Φ PD23.1 infecting pectinolytic *Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp. **PloS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0119812, 2015.

D'HERELLE, F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentérique. **Comptes Rendus Academie des Sciences**, v. 165, p. 373–375, 1917.

DA SILVA, A. C. R. et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, n. 6887, p. 459–463, 23 maio 2002.

DANOVARO, R. et al. Marine viruses and global climate change. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 6, p. 993–1034, nov. 2011.

- DAS, M. et al. Control of Pierce's Disease by phage. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–15, 2015.
- DI LALLO, G. et al. Isolation and partial characterization of bacteriophages infecting *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, causal agent of kiwifruit bacterial canker. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, n. 11, p. 1210–1221, 1 nov. 2014.
- DÍAZ-MUÑOZ, S. L.; KOSKELLA, B. Bacteria–Phage Interactions in Natural Environments. In: **Advances in applied microbiology**. [s.l: s.n.]. v. 89p. 135–183.
- DÖMÖTÖR, D. et al. Comparative analysis of two bacteriophages of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 43, p. 371–377, set. 2016.
- EDDY, S. R. Accelerated Profile HMM Searches. **PLOS Computational Biology**, v. 7, n. 10, p. e1002195, out. 2011.
- ERENCE, C. M. et al. Recent Advances in Understanding *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Pathogenesis and Citrus Canker Disease Management. **Molecular Plant Pathology**, v. Accepted A, 2018.
- FERGUSON, S. et al. Lytic bacteriophages reduce *Escherichia coli* O157. **Bacteriophage**, v. 3, n. 1, p. e24323, 22 jan. 2013.
- FERRAZ, F. DE S. **Seleção de linhagens selvagens de *Xanthomonas* sp.** [s.l: s.n.].
- FUJIWARA, A. et al. Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 12, p. 4155–4162, 2011.
- FUNDECITRUS. **Levantamento da incidência das doenças dos citros: greening, CVC e cancro cítrico no cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro.** [s.l: s.n.].
- GARCÍA, R. et al. **Bacteriophage production models: An overview** **Frontiers in Microbiology** **Frontiers**, , 2019.
- GAŠIĆ, K. et al. Complete genome of the *Xanthomonas euvesicatoria* specific bacteriophage KΦ1, its survival and potential in control of pepper bacterial spot. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. AUG, p. 2021, 29 ago. 2018.
- GOTO, M. **Fundamentals of Bacterial Plant Pathology.** [s.l: s.n.].
- GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. Citrus Canker : The Pathogen and Its Impact Plant Health Progress Plant Health Progress. **Plant Management Network.**, v. 1993, n. August, p. 48824, 2002.

- GRAHAM, J. H. et al. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 1 jan. 2004.
- HAO, G. et al. Reduced Susceptibility to *Xanthomonas citri* in Transgenic Citrus Expressing the FLS2 Receptor From *Nicotiana benthamiana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 29, n. 2, p. 132–142, fev. 2016.
- HAO, G.; ZHANG, S.; STOVER, E. Transgenic expression of antimicrobial peptide D2A21 confers resistance to diseases incited by *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* and *Xanthomonas citri*, but not *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **PLOS ONE**, v. 12, n. 10, p. e0186810, 19 out. 2017.
- HONG, S. et al. CRISPR RNA and anti-CRISPR protein binding to the *Xanthomonas albilineans* Csy1-Csy2 heterodimer in the type I-F CRISPR-Cas system. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 8, p. 2744–2754, 23 fev. 2018.
- IBRAHIM, Y. E.; SALEH, A. A.; AL-SALEH, M. A. Management of Asiatic Citrus Canker Under Field Conditions in Saudi Arabia Using Bacteriophages and Acibenzolar- *S* -Methyl. **Plant Disease**, v. 101, n. 5, p. 1–25, 24 maio 2017.
- IRIARTE, F. B. et al. Factors affecting survival of bacteriophage on tomato leaf surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1704–1711, mar. 2007.
- JONES, J. B. et al. Considerations for using bacteriophages for plant disease control. **Bacteriophage**, v. 2, n. 4, p. e23857, 2012.
- JUNCKER, A. S. et al. Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 12, n. 8, p. 1652–1662, ago. 2003.
- JURAČ, K.; NABERGOJ, D.; PODGORNIK, A. Bacteriophage production processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 2, p. 685–694, 18 jan. 2019.
- KEEN, E. C. A century of phage research: bacteriophages and the shaping of modern biology. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 37, n. 1, p. 6–9, jan. 2015.
- KIM, S. G. et al. Strategy for mass production of lytic *Staphylococcus aureus* bacteriophage pSa-3: contribution of multiplicity of infection and response surface methodology. **Microbial Cell Factories**, v. 20, n. 1, p. 1–12, 2 mar. 2021.
- KORF, I. H. E. et al. In vitro evaluation of a phage cocktail controlling infections with *Escherichia*

coli. **Viruses**, v. 12, n. 12, 1 dez. 2020.

KORTRIGHT, K. E.; CHAN, B. K.; TURNER, P. E. High-throughput discovery of phage receptors using transposon insertion sequencing of bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 31, p. 18670–18679, 4 ago. 2020.

KROGH, A. et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **Journal of molecular biology**, v. 305, n. 3, p. 567–580, jan. 2001.

KROPINSKI, A. M.; PRANGISHVILI, D.; LAVIGNE, R. Position paper: The creation of a rational scheme for the nomenclature of viruses of Bacteria and Archaea. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 2775–2777, nov. 2009.

KWON, J. et al. Isolation and characterization of salmonella jumbo-phage psal-snuabm-04. **Viruses**, v. 13, n. 1, 1 jan. 2021.

LANG, A. S.; ZHAXYBAYEVA, O.; BEATTY, J. T. Gene transfer agents: Phage-like elements of genetic exchange. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 7, p. 472–482, jul. 2012.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, v. 9, n. 4, p. 357–359, 4 abr. 2012.

LIM, J.-A. et al. Biocontrol of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* using bacteriophage PP1. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 23, n. 8, p. 1147–53, ago. 2013.

MALLMANN, W. L.; HEMSTREET, C. ISOLATION OF AN INHIBITORY SUBSTANCE FROM PLANTS 1. **Journal of Agricultural Research**, v. 28, p. 599–602, 1924.

MANCUSO, F.; SHI, J.; MALIK, D. J. High throughput manufacturing of bacteriophages using continuous stirred tank bioreactors connected in series to ensure optimum host bacteria physiology for phage production. **Viruses**, v. 10, n. 10, p. 1., 1 out. 2018.

MANOHAR, P. et al. Isolation, characterization and in vivo efficacy of *Escherichia* phage myPSH1131. **PLoS ONE**, v. 13, n. 10, 1 out. 2018.

MCNAIR, K. et al. PHANOTATE: a novel approach to gene identification in phage genomes. **Bioinformatics**, v. 35, n. 22, p. 4537–4542, 1 nov. 2019.

MILLER, E. S. et al. Bacteriophage T4 genome. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 1, p. 86–156, 2003.

MIRZAEI, M. K. et al. Genomic, proteomic, morphological, and phylogenetic analyses of vB-EcoP-

- SU10, a podoviridae phage with C3 morphology. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–19, 2014.
- MOORE, E. S. D’Herelle’s bacteriophage in relation to plant parasites. **South African Journal of Science**, v. 23, p. 306, 1926.
- MOREIRA, L. M. et al. Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 238, 13 abr. 2010.
- NAGY, J. K.; KIRÁLY, L.; SCHWARCZINGER, I. Phage therapy for plant disease control with a focus on fire blight. **Central European Journal of Biology**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2012.
- NAKAYINGA, R. et al. *Xanthomonas* bacteriophages: a review of their biology and biocontrol applications in agriculture. **BMC Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 1–20, 2021.
- NARR, A. et al. Soil viral communities vary temporally and along a land use transect as revealed by virus-like particle counting and a modified community fingerprinting approach (fRAPD). **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 10 out. 2017.
- NAZIR, A. et al. Sequence Analysis of a Jumbo Bacteriophage, Xoo-sp14, That Infects *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Microbiology Resource Announcements**, v. 9, n. 48, 25 nov. 2020.
- NOBREGA, F. L. et al. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 12, p. 760–773, 2018.
- OLIVEIRA, M. et al. Effectiveness of a bacteriophage in reducing *Listeria monocytogenes* on fresh-cut fruits and fruit juices. **Food Microbiology**, v. 38, p. 137–142, abr. 2014.
- OMNILYTICS. **AgriPhage Citrus Canker Label**, [s.d.]. Disponível em: <https://www.omnilytics.com/wp-content/uploads/2021/11/AGRIPHAGE-CITRUS_CANKER_Label.pdf>
- PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, n. 10, p. 785–786, 29 set. 2011.
- PETKAU, A. et al. Interactive microbial genome visualization with GView. **Bioinformatics**, v. 26, n. 24, p. 3125–3126, 15 dez. 2010.
- PRICE, M. N.; DEHAL, P. S.; ARKIN, A. P. FastTree: Computing Large Minimum Evolution Trees with Profiles instead of a Distance Matrix. **Molecular Biology and Evolution**, v. 26, n. 7, p. 1641–1650, 1 jul. 2009.

- RICHARD, D. et al. First Report of Copper-resistant *Xanthomonas citri* pv. *citri* Pathotype A Causing Asiatic Citrus Canker in Réunion, France. **Plant Disease**, v. 101, n. 3, p. 503, 5 mar. 2017.
- ROMBOUTS, S. et al. Characterization of Novel Bacteriophages for Biocontrol of Bacterial Blight in Leek Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *porri*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 279, 15 mar. 2016.
- ROMERO-SUAREZ, S.; JORDAN, B.; HEINEMANN, J. A. Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, the causal agent of walnut blight disease. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 1917–1927, 7 maio 2012.
- RUSKA, H. Die Sichtbarmachung der bakteriophagen Lyse im Übermikroskop. **Naturwissenschaften**, v. 28, n. 3, p. 45–46, 1940.
- SALMOND, G. P. C.; FINERAN, P. C. A century of the phage: Past, present and future. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 12, p. 777–786, 2015.
- SAUVAGEAU, D.; COOPER, D. G. Two-stage, self-cycling process for the production of bacteriophages. **Microbial Cell Factories**, v. 9, p. 81, 1 nov. 2010.
- SNYDER, L. et al. **Molecular genetics of bacteria**. 4th. ed. [s.l.] ASM Press, 2013.
- SOLIOZ, M.; MARRS, B. The gene transfer agent of *Rhodopseudomonas capsulata*.: Purification and characterization of its nucleic acid. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 181, n. 1, p. 300–307, 1 maio 1977.
- SUMMERS, W. C. The strange history of phage therapy. **Bacteriophage**, v. 2, n. 2, p. 130–133, 2012.
- THOMAS, R. C. A bacteriophage in relation to Stewart's disease of corn. **Phytopathology**, v. 25, p. 371–372, 1935.
- TWORT, F. W. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. **The Lancet**, v. 186, n. 4814, p. 1241–1243, 4 dez. 1915.
- VIDAVER, A. K. Prospects for Control of Phytopathogenic Bacteria by Bacteriophages and Bacteriocins. **Annual Review of Phytopathology**, v. 14, n. 1, p. 451–465, 1976.
- VILORIA, Z. et al. Screening Triploid Hybrids of 'Lakeland' Limequat for Resistance to Citrus Canker. **Plant Disease**, v. 88, n. 10, p. 1056–1060, 2004.

VOJNOV, A. A. et al. Bacteria causing important diseases of citrus utilise distinct modes of pathogenesis to attack a common host. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 467–477, 2010.

WEI, C. et al. Developing a bacteriophage cocktail for biocontrol of potato bacterial wilt. **Virologica Sinica**, v. 32, n. 6, p. 476–484, 2017.

YANG, M. et al. Isolation and Characterization of the Novel Phages vB_VpS_BA3 and vB_VpS_CA8 for Lysing *Vibrio parahaemolyticus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 259, 21 fev. 2020.

YEH, T.-Y. XerD-dependent integration of a novel filamentous phage Cf2 into the *Xanthomonas citri* genome. **Virology**, v. 548, p. 160–167, set. 2020.

YEH, T. Y. Complete nucleotide sequence of a new filamentous phage, Xf109, which integrates its genome into the chromosomal DNA of *Xanthomonas oryzae*. **Archives of Virology**, v. 162, n. 2, p. 567–572, 14 fev. 2017.

YOSHIKAWA, G. et al. *Xanthomonas citri* jumbo phage XacN1 exhibits a wide host range and high complement of tRNA genes. **Scientific Reports**, v. 8, n. November 2017, p. 4486, 14 mar. 2018.

ZURABOV, F.; ZHILENKOV, E. Characterization of four virulent *Klebsiella pneumoniae* bacteriophages, and evaluation of their potential use in complex phage preparation. **Virology Journal**, v. 18, n. 1, 1 dez. 2021.

8 Anexo A – Publicação derivada do trabalho

O artigo “Isolation and characterization of vB_XciM_LucasX, a new jumbo phage that infects *Xanthomonas citri* and *Xanthomonas fuscans*”, contendo a maior parte dos resultados desse trabalho, foi publicado na revista PLOS ONE em abril de 2022. O artigo pode ser acessado pelo link <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0266891>. A primeira página do artigo é reproduzida abaixo.





RESEARCH ARTICLE

Isolation and characterization of vB_XciM_LucasX, a new jumbo phage that infects *Xanthomonas citri* and *Xanthomonas fuscans*

Vinícius Marquioni¹, Fernando Pacheco Nobre Rossi², Deborah Cezar Mendonça³, Layla Farage Martins², Franklin Behlau⁴, João Carlos Setubal², Aline Maria da Silva², Maria Teresa Marques Novo-Mansur^{1*}

1 Departamento de Genética e Evolução (DGE), Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Aplicada (LBBMA), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, São Paulo, Brazil, 2 Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo, Brazil, 3 Grupo de Biofísica e Biologia Estrutural “Sérgio Mascarenhas”, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, São Paulo, Brazil, 4 Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), Araraquara, São Paulo, Brazil

* marinovo@ufscar.br

OPEN ACCESS

Citation: Marquioni V, Rossi FPN, Mendonça DC, Martins LF, Behlau F, Setubal JC, et al. (2022) Isolation and characterization of vB_XciM_LucasX, a new jumbo phage that infects *Xanthomonas citri* and *Xanthomonas fuscans*. PLOS ONE 17(4): e0266891. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266891>

Editor: Seon-Woo Lee, Dong-A University, REPUBLIC OF KOREA

Received: September 16, 2021

Accepted: March 30, 2022

Published: April 14, 2022

Copyright: © 2022 Marquioni et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The genome of vB_XciM_LucasX is publicly available. It has been submitted to NCBI and can be found here: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/MW825358.1> (accession number MW825358).

Funding: This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) - Finance Code 001 (VM) and by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Programa Jovem

Abstract

Citrus canker is one of the main bacterial diseases that affect citrus crops and is caused by *Xanthomonas citri* which affects all citrus species worldwide. New strategies to control citrus canker are necessary and the use of bacteriophages as biocontrol agent could be an alternative. Phages that infect *Xanthomonas* species have been studied, such as XacN1, a myovirus that infects *X. citri*. Here we report the isolation and characterization of a new jumbo phage, vB_XciM_LucasX, which infects *X. citri* and *X. fuscans*. Transmission electron microscopy allowed classification of LucasX in the Myoviridae family, which was corroborated by its genomic sequencing, annotation, and proteome clustering. LucasX has a 305,651 bp-long dsDNA genome. ORF prediction and annotation revealed 157 genes encoding putative structural proteins such as capsid and tail related proteins and phage assembly associated proteins, however, for most of the structural proteins it was not possible to assign specific functions. Its genome encodes several proteins related to DNA replication and nucleotide metabolism, five putative RNA polymerases, at least one homing endonuclease mobile element, a terminase large subunit (TerL), an endolysin and many proteins classified as beneficial to the host. Proteome clustering and phylogeny analyses showed that LucasX is a new jumbo phage having as its closest neighbor the *Xanthomonas* jumbo phage Xoo-sp14. LucasX presented a burst size of 40 PFU/infected cell of *X. citri* 306, was completely inactivated at temperatures above 50°C, presented survival lower than 25% after 80 s of exposition to artificial UV light and had practically no tolerance to concentrations above 2.5 g/L NaCl or 40% ethanol. LucasX presented optimum pH at 7 and a broad range of *Xanthomonas* hosts, infecting twenty-one of the twenty-three strains tested. Finally, the LucasX yield was dependent on the host strain utilized, resulting one order of

PLOS ONE | <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266891> April 14, 2022

1 / 19

9 Anexo B – ORFs anotadas no genoma do fago vB_XciM_LucasX

ORF	Início	Fim	Anotação
LUCX_1	64	1551	hypothetical protein
LUCX_2	1683	3908	hypothetical protein
LUCX_3	3975	11354	hypothetical protein
LUCX_4	11420	12943	hypothetical protein, similar to putative RNA polymerase beta subunit
LUCX_5	13307	13459	hypothetical protein
LUCX_6	13478	14818	hypothetical protein
LUCX_7	14890	19281	hypothetical protein, similar to putative RNA polymerase beta subunit
LUCX_8	19285	19500	hypothetical protein
LUCX_9	19506	20936	hypothetical protein
LUCX_10	20948	21673	hypothetical protein
LUCX_11	21683	22453	hypothetical protein, similar to putative virion structural protein
LUCX_12	22585	22683	hypothetical protein
LUCX_13	22803	24080	ATPase or Cell division protein FtsH
LUCX_14	24080	24460	hypothetical protein
LUCX_15	24530	24868	hypothetical protein
LUCX_16	24870	25112	hypothetical protein
LUCX_17	25100	25477	hypothetical protein
LUCX_18	25647	26141	hypothetical protein
LUCX_19	26230	26397	hypothetical protein
LUCX_20	26394	26567	hypothetical protein
LUCX_21	26577	26975	hypothetical protein
LUCX_22	26972	27442	hypothetical protein
LUCX_23	27435	27926	hypothetical protein
LUCX_24	27926	28579	hypothetical protein
LUCX_25	28576	28776	hypothetical protein
LUCX_26	28994	29488	hypothetical protein
LUCX_27	29559	30431	Phage protein, similar to putative virion structural protein
LUCX_28	30474	32585	hypothetical protein, similar to putative tail sheath protein
LUCX_29	32790	33716	hypothetical protein
LUCX_30	33709	36285	hypothetical protein, similar to putative virion structural protein
LUCX_31	36390	38093	Phage protein, similar to virion structural protein
LUCX_32	38161	40410	Phage protein, similar to putative terminase large subunit
LUCX_33	40456	40818	hypothetical protein
LUCX_34	40815	41216	hypothetical protein
LUCX_35	41244	42464	Aldehyde dehydrogenase
LUCX_36	42899	43846	hypothetical protein
LUCX_37	44167	44733	hypothetical protein
LUCX_38	44820	45359	hypothetical protein

LUCX_39	45375	45995	hypothetical protein
LUCX_40	46032	46484	hypothetical protein
LUCX_41	46595	47086	hypothetical protein
LUCX_42	47147	47947	hypothetical protein
LUCX_43	48116	48619	hypothetical protein
LUCX_44	48647	49627	hypothetical protein
LUCX_45	49684	49884	hypothetical protein
LUCX_46	49917	50342	hypothetical protein
LUCX_47	50339	50779	hypothetical protein
LUCX_48	50920	51309	hypothetical protein
LUCX_49	51326	52021	hypothetical protein
LUCX_50	52021	52464	hypothetical protein
LUCX_51	52827	53216	hypothetical protein
LUCX_52	53216	53677	hypothetical protein
LUCX_53	53688	54116	hypothetical protein
LUCX_54	54129	54497	hypothetical protein
LUCX_55	54537	54944	hypothetical protein
LUCX_56	55215	57521	hypothetical protein
LUCX_57	57588	58676	hypothetical protein
LUCX_58	58768	58890	hypothetical protein
LUCX_59	58991	60934	hypothetical protein
LUCX_60	61185	62456	hypothetical protein, similar to RNA polymerase beta subunit
LUCX_61	62898	63056	hypothetical protein
LUCX_62	63121	63447	hypothetical protein
LUCX_63	63508	64014	hypothetical protein
LUCX_64	64024	64149	hypothetical protein
LUCX_65	64207	64611	hypothetical protein
LUCX_66	64663	65283	hypothetical protein
LUCX_67	65368	65784	hypothetical protein
LUCX_68	65781	66422	hypothetical protein
LUCX_69	66385	66990	hypothetical protein
LUCX_70	67005	68120	Phage protein, similar to putative nuclease SbcCD, D subunit
LUCX_71	68122	68964	hypothetical protein
LUCX_72	69018	69824	hypothetical protein
LUCX_73	70167	71753	hypothetical protein
LUCX_74	71753	73255	hypothetical protein
LUCX_75	73233	74438	hypothetical protein
LUCX_76	74481	74828	hypothetical protein
LUCX_77	74936	75472	hypothetical protein
LUCX_78	75549	77957	Phage protein, similar to putative RNA polymerase beta subunit
LUCX_79	77964	79901	hypothetical protein, similar to putative RNA polymerase beta subunit
LUCX_80	79999	82644	Replicative DNA helicase (DnaB)
LUCX_81	82656	83297	hypothetical protein

LUCX_82	83313	83855	hypothetical protein
LUCX_83	83926	84498	hypothetical protein
LUCX_84	84526	84915	hypothetical protein
LUCX_85	84978	86750	hypothetical protein, similar to putative DNA polymerase
LUCX_86	86844	88196	hypothetical protein
LUCX_87	88219	88632	hypothetical protein
LUCX_88	88632	89711	hypothetical protein
LUCX_89	89769	90107	hypothetical protein
LUCX_90	90226	90690	Permease of the drug/metabolite transporter (DMT) superfamily
LUCX_91	90933	92234	hypothetical protein, similar to putative RNA polymerase beta subunit
LUCX_92	92244	93056	hypothetical protein
LUCX_93	93157	93597	hypothetical protein
LUCX_94	93612	95306	hypothetical protein
LUCX_95	95333	95773	hypothetical protein
LUCX_96	96175	96726	hypothetical protein
LUCX_97	96723	97181	hypothetical protein
LUCX_98	97292	97846	hypothetical protein
LUCX_99	97847	98221	hypothetical protein
LUCX_100	98234	98875	hypothetical protein
LUCX_101	98893	99258	hypothetical protein
LUCX_102	99318	99737	hypothetical protein
LUCX_103	99754	100125	hypothetical protein
LUCX_104	100188	103103	hypothetical protein, similar to putative virion structural protein
LUCX_105	103118	104188	hypothetical protein, similar to putative virion structural protein
LUCX_106	104216	105391	hypothetical protein, similar to virion structural protein
LUCX_107	105411	106325	hypothetical protein
LUCX_108	106355	106858	hypothetical protein
LUCX_109	106875	109250	hypothetical protein
LUCX_110	109345	109743	hypothetical protein
LUCX_111	109821	111152	hypothetical protein
LUCX_112	111158	112441	hypothetical protein
LUCX_113	112553	114652	hypothetical protein
LUCX_114	114832	115257	hypothetical protein
LUCX_115	115301	115741	hypothetical protein
LUCX_116	115893	116060	hypothetical protein
LUCX_117	116122	116862	hypothetical protein
LUCX_118	116973	117110	hypothetical protein
LUCX_119	117166	117291	hypothetical protein
LUCX_120	117319	117762	hypothetical protein
LUCX_121	117879	119540	hypothetical protein
LUCX_122	119578	120834	hypothetical protein, similar to virion structural protein
LUCX_123	120834	121481	hypothetical protein

LUCX_124	121472	122839	hypothetical protein, similar to putative virion structural protein
LUCX_125	122849	123358	hypothetical protein
LUCX_126	123412	123864	hypothetical protein
LUCX_127	123864	124028	hypothetical protein
LUCX_128	124127	124873	Thymidylate kinase
LUCX_129	124866	125387	hypothetical protein
LUCX_130	125391	126293	hypothetical protein
LUCX_131	126313	126939	hypothetical protein
LUCX_132	126923	127153	hypothetical protein
LUCX_133	127230	128045	Phage peptidoglycan hydrolase
LUCX_134	128159	128497	hypothetical protein
LUCX_135	128497	129108	hypothetical protein
LUCX_136	129123	129455	hypothetical protein
LUCX_137	129472	129651	hypothetical protein
LUCX_138	129717	130889	Thymidylate synthase
LUCX_139	130933	131076	hypothetical protein
LUCX_140	131085	131948	hypothetical protein
LUCX_141	132009	132593	hypothetical protein
LUCX_142	132596	132919	hypothetical protein
LUCX_143	133003	134145	hypothetical protein
LUCX_144	134266	135072	hypothetical protein
LUCX_145	135135	135347	hypothetical protein
LUCX_146	136026	136229	hypothetical protein
LUCX_147	136210	136509	hypothetical protein
LUCX_148	137145	137684	hypothetical protein
LUCX_149	138211	139173	hypothetical protein
LUCX_150	139407	140498	Nicotinamide-nucleotide adenyltransferase, NadM family / ADP-ribose pyrophosphatase
LUCX_151	140559	141959	Nicotinamide phosphoribosyltransferase
LUCX_152	142123	142704	hypothetical protein
LUCX_153	142979	143278	hypothetical protein
LUCX_154	143284	143520	hypothetical protein
LUCX_155	144720	145016	hypothetical protein
LUCX_156	145083	145322	hypothetical protein
LUCX_157	145367	145552	hypothetical protein
LUCX_158	145634	146146	hypothetical protein
LUCX_159	146154	146984	hypothetical protein
LUCX_160	147035	147259	hypothetical protein
LUCX_161	147334	147825	hypothetical protein
LUCX_162	147889	148095	hypothetical protein
LUCX_163	148348	148680	hypothetical protein
LUCX_164	148742	148924	hypothetical protein
LUCX_165	148937	149080	hypothetical protein
LUCX_166	149176	149430	hypothetical protein
LUCX_167	149484	149999	hypothetical protein

LUCX_168	150025	150621	hypothetical protein
LUCX_169	150717	151349	hypothetical protein
LUCX_170	151447	151689	hypothetical protein
LUCX_171	151720	151890	hypothetical protein
LUCX_172	151906	152262	hypothetical protein
LUCX_173	152351	153022	hypothetical protein
LUCX_174	153136	153648	hypothetical protein
LUCX_175	153735	154190	hypothetical protein
LUCX_176	154221	156710	hypothetical protein
LUCX_177	156755	160555	hypothetical protein
LUCX_178	160646	162745	hypothetical protein
LUCX_179	162817	164586	hypothetical protein
LUCX_180	164657	166729	Phage DNA helicase or terminase, large subunit
LUCX_181	166886	167500	hypothetical protein
LUCX_182	167524	167943	hypothetical protein
LUCX_183	167930	168175	hypothetical protein
LUCX_184	168234	169667	hypothetical protein
LUCX_185	169821	170180	hypothetical protein
LUCX_186	170196	170600	hypothetical protein
LUCX_187	170735	171058	hypothetical protein
LUCX_188	171098	171382	hypothetical protein
LUCX_189	171474	171791	hypothetical protein
LUCX_190	171901	172578	hypothetical protein
LUCX_191	172666	173373	hypothetical protein
LUCX_192	173409	173873	hypothetical protein
LUCX_193	173930	174169	hypothetical protein
LUCX_194	174977	175255	hypothetical protein
LUCX_195	175326	175574	hypothetical protein
LUCX_196	175582	176148	hypothetical protein
LUCX_197	176196	176585	hypothetical protein
LUCX_198	176680	177102	hypothetical protein
LUCX_199	177102	177329	hypothetical protein
LUCX_200	177332	177973	hypothetical protein
LUCX_201	177983	178747	hypothetical protein
LUCX_202	178820	178957	hypothetical protein
LUCX_203	179050	179271	hypothetical protein
LUCX_204	179275	180111	Deoxycytidine triphosphate deaminase
LUCX_205	180114	180608	hypothetical protein
LUCX_206	180699	181226	hypothetical protein
LUCX_207	181213	181563	hypothetical protein
LUCX_208	181563	181799	hypothetical protein
LUCX_209	181902	182180	hypothetical protein
LUCX_210	182182	182559	hypothetical protein
LUCX_211	182573	183034	hypothetical protein
LUCX_212	183036	183389	hypothetical protein
LUCX_213	183404	183952	hypothetical protein

LUCX_214	183954	184235	hypothetical protein
LUCX_215	184232	184858	hypothetical protein
LUCX_216	184858	185523	hypothetical protein
LUCX_217	185685	186026	hypothetical protein
LUCX_218	186160	188421	DNA ligase (NAD(+))
LUCX_219	188473	189246	hypothetical protein
LUCX_220	189246	189431	hypothetical protein
LUCX_221	189436	189618	hypothetical protein
LUCX_222	189632	189958	hypothetical protein
LUCX_223	189980	190408	hypothetical protein
LUCX_224	190796	191797	hypothetical protein
LUCX_225	191911	193737	Single-stranded-DNA-specific exonuclease RecJ
LUCX_226	193748	194173	hypothetical protein
LUCX_227	194170	194448	hypothetical protein
LUCX_228	194520	194846	hypothetical protein
LUCX_229	194846	195673	hypothetical protein
LUCX_230	195670	196074	hypothetical protein
LUCX_231	196150	196650	hypothetical protein
LUCX_232	196647	197501	hypothetical protein, similar to SPFH domain-containing protein
LUCX_233	197550	197984	hypothetical protein
LUCX_234	198035	198880	hypothetical protein
LUCX_235	198867	199472	hypothetical protein
LUCX_236	199597	199947	hypothetical protein
LUCX_237	199995	200489	hypothetical protein
LUCX_238	200491	200781	hypothetical protein
LUCX_239	200888	201673	Phosphate starvation-inducible protein PhoH, predicted ATPase
LUCX_240	201780	202052	hypothetical protein
LUCX_241	202350	204971	Ribonucleotide reductase of class Ia (aerobic), alpha subunit
LUCX_242	205041	206201	Ribonucleotide reductase of class Ia (aerobic), beta subunit
LUCX_243	206236	206598	hypothetical protein
LUCX_244	206680	212745	Gene Transfer Agent host specificity protein
LUCX_245	212824	213336	hypothetical protein
LUCX_246	213340	216858	hypothetical protein
LUCX_247	216992	219121	hypothetical protein
LUCX_248	219286	219633	hypothetical protein
LUCX_249	219747	221174	hypothetical protein
LUCX_250	221178	221528	hypothetical protein
LUCX_251	221704	222936	hypothetical protein
LUCX_252	222929	223522	hypothetical protein
LUCX_253	223573	223851	hypothetical protein
LUCX_254	223965	225653	hypothetical protein
LUCX_255	225755	226408	hypothetical protein
LUCX_256	226405	226737	hypothetical protein

LUCX_257	226737	226991	hypothetical protein
LUCX_258	227001	227222	hypothetical protein
LUCX_259	227242	227523	hypothetical protein
LUCX_260	227581	227886	hypothetical protein
LUCX_261	227948	228178	hypothetical protein
LUCX_262	228243	229004	hypothetical protein
LUCX_263	229184	229810	hypothetical protein
LUCX_264	230020	230433	hypothetical protein
LUCX_265	230738	231748	hypothetical protein
LUCX_266	231768	231920	hypothetical protein
LUCX_267	231930	233057	hypothetical protein
LUCX_268	233094	233720	hypothetical protein
LUCX_269	233779	234201	hypothetical protein
LUCX_270	234221	234493	hypothetical protein
LUCX_271	234483	234683	hypothetical protein
LUCX_272	234680	235231	Dihydrofolate reductase
LUCX_273	235310	235813	hypothetical protein
LUCX_274	235986	236468	hypothetical protein
LUCX_275	236558	237049	hypothetical protein
LUCX_276	237079	237555	hypothetical protein
LUCX_277	237638	238729	hypothetical protein
LUCX_278	238860	239396	hypothetical protein
LUCX_279	239478	240044	hypothetical protein
LUCX_280	240116	241012	hypothetical protein
LUCX_281	241020	241202	hypothetical protein
LUCX_282	241288	241635	hypothetical protein
LUCX_283	241743	243341	hypothetical protein, similar to putative DnaB helicase
LUCX_284	243373	243903	hypothetical protein
LUCX_285	244153	246420	hypothetical protein, similar to major capsid protein
LUCX_286	246659	247864	hypothetical protein
LUCX_287	247884	249545	hypothetical protein, similar to putative RNA polymerase beta subunit
LUCX_288	249606	251690	hypothetical protein
LUCX_289	251748	252116	hypothetical protein
LUCX_290	252287	255190	hypothetical protein, similar to putative virion structural protein
LUCX_291	255237	257981	hypothetical protein, similar to virion structural protein
LUCX_292	258051	258506	hypothetical protein
LUCX_293	258516	260267	hypothetical protein
LUCX_294	260277	260840	hypothetical protein
LUCX_295	260842	261339	hypothetical protein
LUCX_296	261460	262746	hypothetical protein
LUCX_297	262783	266142	hypothetical protein
LUCX_298	266198	270862	hypothetical protein
LUCX_299	270917	271366	hypothetical protein
LUCX_300	271376	271897	hypothetical protein

LUCX_301	271982	272512	hypothetical protein
LUCX_302	272699	273562	hypothetical protein, similar to putative virion structural protein
LUCX_303	273582	274166	hypothetical protein
LUCX_304	274179	274667	hypothetical protein
LUCX_305	274718	275326	Phage protein
LUCX_306	275385	276731	hypothetical protein
LUCX_307	276741	278849	hypothetical protein, similar to putative virion-associated protein
LUCX_308	278880	282236	hypothetical protein, similar to putative tail fiber protein
LUCX_309	282371	283615	hypothetical protein, similar to virion structural protein
LUCX_310	283660	284073	hypothetical protein
LUCX_311	284057	284506	hypothetical protein
LUCX_312	284529	285521	hypothetical protein
LUCX_313	285618	288077	hypothetical protein, similar to putative SbcCD protein, C subunit
LUCX_314	288108	289376	hypothetical protein
LUCX_315	289431	290471	hypothetical protein
LUCX_316	290482	290958	hypothetical protein
LUCX_317	291008	291625	hypothetical protein
LUCX_318	291638	293386	hypothetical protein, similar to virion structural protein
LUCX_319	293464	294042	hypothetical protein
LUCX_320	294039	294365	hypothetical protein
LUCX_321	294427	295890	Ribonuclease HI
LUCX_322	295908	296345	hypothetical protein
LUCX_323	296415	297230	hypothetical protein
LUCX_324	297395	298114	hypothetical protein
LUCX_325	298149	299681	Phage protein, similar to putative UvsX protein
LUCX_326	299699	300115	hypothetical protein
LUCX_327	300164	300856	hypothetical protein, similar to putative virion structural protein
LUCX_328	300863	301405	hypothetical protein
LUCX_329	301402	302211	hypothetical protein
LUCX_330	302254	302727	hypothetical protein
LUCX_331	302918	303478	hypothetical protein
LUCX_332	303523	304125	hypothetical protein
LUCX_333	304134	304880	Assimilatory nitrate reductase large subunit
LUCX_334	304978	305571	hypothetical protein

10 Anexo C – Sequências codificantes das proteínas clonadas

Domínio de lisozima (ORF LUCX_3)

AAGCCCTTGTTTGATGCGGTGGCCAAGATGACGGGTGTTGACCCGAACATGCTCTACG
 CCATTGCCTCGATCGAGTCCACCTTCAATCCAGGTGCCAAGGCCCGACCTCCTCTGCC
 TCAGGGTTGTTCCAGTTCATCAATGGAACCTGGGGTAACATGATCGGTAAAGTACGGTG
 CCAAGTTTGGCCTGTCGCCCAATGCCTCCCCGTTTGATCCCAAGGCCAATGCGCTGATG
 GGAGCCATGTTCTTGAAGGATAACTTCAACTTCTTGAAGTCGCGTTTGTCTCGCGGTGT
 GAATGAGACAGACATGTACATGGCCACTTCATGGGTGCAGGTGGGGCTGCCAAGTTC
 CTGTCCGCTGATCCGAAGCTCAACGCGGTCCAAAGCTTCCCCAAGGAAGCCAAGGCCA
 ACCCGTGGATCTTCTATCAGATGCAGAAGCAAGGCAACCGTAGCGTGCCC

Domínio catalítico (ORF LUCX_133)

GGTATGGTCCATGCTCTGGCCATGAAGGAAACCAATGGCGCGGCGTTCTTGTCTGATG
 GTCGTACCAAGATCTTGTGTTGAACGTCACCAGTTCTACAAGCGCTTCCGATTGTGCGC
 AAGCCCGGTCAAACCCAGGCAGGTCTGTTGGCCGAACGCAACACCATTGCTGCTGCCA
 ATCCTGATATCTGTAACGCCACCCGTGGCGGCTATAAGGGCGGGGCGGCCGAGTATGA
 CCGACTGGCACGTGCCAGAAGTTCTCAGACACGGCGGCTTTGGAATCGGCCAGCTGG
 GGACAGTTCAGGTTCATGGGGTTTAATGCCGTTCCGATCGGCTACCCACCGTCCAAG
 AATTTGCCCGACTGATGCAGCAGGGTGTGGACCAGCACTTGATTGCCCTGTGCCGTTTC
 ATCCAGGCCACCCCGAAGGCCCTAAAGGGCATTTCGGACGCAAGACTTTGCGATGCTGG
 CAGGAGCCTATAACGGTCCGGCCTATCATGAGAACAAGTACGACACGGATCTGAAGAA
 GTACTTTGATCAGGTCAAGGGTCAGTACTAA

Proteína completa (LUCX_133)

ATGTTGCTCAAACCTGAACGATCGCGGTGATGCGGTCAAAGATATCCAGGCCAAACTCG
 GTCTGACAGCAGACGGGTTCTTTGGCCGAAAACCTGAGGCAGCCGTCAAAGCCTTCCA
 GCAGAAGAATGGACTGGGCGCTGATGGTATCGTCGGTCCGGCCACGCTGACCAAGTTG
 GGTCTGCAAGAAGAGAAGGTTGTCTCGGCCCGCACGTTGACCAAGGAAGATTACGTCT
 ACGGCGGTGAGTTTTTTGAAGTGCCATCCGGGTATGGTCCATGCTCTGGCCATGAAGGA
 AACCAATGGCGCGGCGTTCTTGTCTGATGGTCGTACCAAGATCTTGTGTTGAACGTCACC
 AGTTCTACAAGCGCTTCCGATTGTGCGCAAGCCCGGTCAAACCCAGGCAGGTCTGTTG
 GCCGAACGCAACACCATTGCTGCTGCCAATCCTGATATCTGTAACGCCACCCGTGGCG
 GCTATAAGGGCGGGGCGGCCGAGTATGACCGACTGGCACGTGCCCAGAAGTTCTCAGA
 CACGGCGGCTTTGGAATCGGCCAGCTGGGGACAGTTCAGGTTCATGGGGTTTAATGCC
 GTTCCGATCGGCTACCCACCGTCCAAGAATTTGCCCGACTGATGCAGCAGGGTGTGG
 ACCAGCACTTGATTGCCCTGTGCCGTTTCATCCAGGCCACCCCGAAGGCCCTAAAGGG
 CATTCGGACGCAAGACTTTGCGATGCTGGCAGGAGCCTATAACGGTCCGGCCTATCAT
 GAGAACAAGTACGACACGGATCTGAAGAAGTACTTTGATCAGGTCAAGGGTCAGTACT
 AA

11 Anexo D – Outras atividades

Link do Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7322282884244635>

Julho/2018: Minicurso “Busca de antígenos vacinais e seleção de aptâmeros: Ferramentas biotecnológicas para a saúde e biodeteccção”, ministrado pelo aluno no Núcleo 18 – Encontro Nacional dos Estudantes de Biotecnologia, realizado na UFSCar – São Carlos

Novembro/2018: Avaliador de resumos e de pôsteres no XXV Congresso de Iniciação Científica (CIC) / X Congresso de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (CIDTI) da UFSCar

Agosto/2019: Minicurso “Introdução à biologia de fagos” (8 horas, teórico-prático), ministrado pelo aluno no IX 4Biotec – Quatro Dias pela Biotecnologia, realizado na UFSCar – São Carlos (<https://fourbiotecufscar.faiufscar.com/pagina/3655-programacao#/>)

Setembro/2019: Co-autor do trabalho “Production and in vitro antigenicity of recombinant proteins from *Erysipelothrix rhusiopathiae* candidates for vaccinal antigens”, apresentado na forma de pôster no 65º Congresso Brasileiro de Genética por Yuri Fuzissaki (primeiro autor) e incluído nos anais do congresso

Outubro/2019: Autor do trabalho “Isolamento e caracterização inicial de um bacteriófago de *Xanthomonas citri*”, apresentado na forma de pôster nas XXVII Jornadas de Jovens Pesquisadores da Associação de Universidades Grupo Montevideu (AUGM), realizado na UFSCar – São Carlos, incluído nos anais do congresso e premiado como melhor pôster da categoria Virologia Molecular (resultado da premiação disponível em <https://jornadasaugm.faiufscar.com/pagina/4040-resultados#/>)

Outubro/2019: Participação no “Divulgathon: ciência sem barreiras”, evento de divulgação científica organizado pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação (ICMC – USP)

Março/2020: Gravação de vídeo sobre o projeto de doutorado para a série Click Ciência, organizada pelo Laboratório Aberto de Interatividade para Disseminação do Conhecimento Científico e Tecnológico da Universidade Federal de São Carlos (LABI – UFSCar), disponível em <https://www.youtube.com/watch?v=Tuv39SmadCY>

Julho/2020: Avaliador de projetos de iniciação científica e tecnológica dos programas PIBIC, PIBIC-Af, PIBITI e ICTSR (Edital 001/2020 ProPQ UFSCar)

Janeiro/ 2021: Publicação como primeiro autor do artigo “Protein identification by database searching of mass spectrometry data in the teaching of proteomics” na revista Journal of Chemical Education, descrevendo uma aula para a graduação sobre identificação de proteínas por espectrometria de massas, proposta pelo aluno durante seu estágio no Programa de Estágio Supervisionado de Capacitação Docente (PESCD) (artigo disponível em <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jchemed.0c00853>)

Junho/2021: Avaliador de projetos de iniciação científica e tecnológica dos programas PIBIC, PIBIC-Af, PIBITI e ICTSR (Edital 001/2021 ProPQ UFSCar)

Julho/2021: Participação no curso de extensão online “Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório”, coordenado pela Central de Bioterismo do ICB-USP em parceria com a FMVZ-USP e realizado pela REBIOTERIO - CNPq (<https://cursosextensao.usp.br/enrol/index.php?id=2340>)

Novembro/2021: Autor do trabalho “Protein identification by database searching in undergraduate education”, apresentado na forma de pôster eletrônico no X Proteomics Workshop (online), promovido pelo Laboratório Nacional de Biociências (LNBio - CNPEM)

Junho/2022: Co-autor do trabalho “Recombinant insect chitinases: DNA cloning and the enzymes expression in *Pichia pastoris*”, apresentado na forma de pôster na 45ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química por Katia Correa (primeira autora) e incluído nos anais do congresso (disponível em http://www.s bq.org.br/45ra/anexos/45RASBQ_resumos.pdf)

Julho/2022: Revisor de artigo do Journal of Chemical Education