

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA
VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
NIVEL DOUTORADO

Isolamento e caracterização genômica de bacteriófago para biocontrole
de *Pseudomonas cichorii*

Márcia Keller Alves

Caxias do Sul

2021

MÁRCIA KELLER ALVES

**Isolamento e caracterização genômica de bacteriófago para biocontrole
de *Pseudomonas cichorii***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul,
visando a obtenção de grau de Doutor em
Biotecnologia.

Orientadores: Prof. Dra. Mariana Roesch Ely e
Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques.

Caxias do Sul

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

A474i Alves, Márcia Keller

Isolamento e caracterização genômica de bacteriófago para biocontrole de *Pseudomonas cichorii* [recurso eletrônico] / Márcia Keller Alves. – 2021.
Dados eletrônicos.

Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2021.

Orientação: Mariana Roesch Ely, João Antonio Pêgas Henriques.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.us.br>

1. Bactérias gram-negativas. 2. *Pseudomonas*. 3. Bacteriófagos. 4. Fitobactéria. I. Ely, Mariana Roesch, orient. II. Henriques, João Antonio Pêgas, orient. III. Título.

CDU 2. ed.: 579.84

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Márcia Servi Gonçalves - CRB 10/1500

MÁRCIA KELLER ALVES

**Isolamento e caracterização genômica de bacteriófago para biocontrole
de *Pseudomonas cichorii***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul,
visando a obtenção de grau de Doutor em
Biotecnologia.

Orientadores: Prof. Dr(a) Mariana Roesch Ely e
Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques.

TESE APROVADA EM _____

Profa. Dra. Mariana Roesch Ely

Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques Orientadores

Prof. Dra. Ana Cristina Afonso Oliveira

Prof. Dra. Cláucia Fernanda Volken de Souza

Profa. Dra. Joséli Schwambach

DEDICATÓRIA

“Eu não tinha sapatos. A roupa era feita pela ‘mamãe’. Eu ia caminhando até a escola. No início, era subir o morro atrás de casa; depois, era caminhar até a Pratinha”.

Dedico este trabalho a alguém muito especial, que viveu uma infância desabastada, cresceu em uma roça do interior de Minas Gerais, e que venceu na vida através do estudo e de seu esforço pessoal. Certamente, uma das pessoas mais evoluídas que eu conheço, intelectual e espiritualmente.

Exemplo a ser seguido: da infância pobre ao pai de família responsável, profissional competente e de reputação ilibada. Com muito orgulho, relato que estive na sua formatura de Curso Superior: o primeiro na família Alves a ter um curso de graduação (Administração), concluído aos 44 anos, juntamente com a esposa Izaura (Enfermagem) – também a primeira da família Keller a obter um título de grau superior.

Propiciou o acesso à educação às quatro filhas – todas com nível superior e pós-graduadas. Esteve na defesa do meu Mestrado em 2006 e, quatro anos depois, na mesma Universidade, pude vê-lo defender com maestria seu Mestrado em Teologia Sistemática, no auge dos 63 anos.

Neste ano, em que você completa 75 anos de vida, eu, que procuro ser humildemente a primeira Doutora da família Keller-Alves, dedico, modestamente, esta tese a você, PAI. A você e à minha querida mãe: obrigada por tudo! Pela vida, pelo amor, pela educação, pelo exemplo, por existir. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Dra Mariana Roesch Ely e Dr João Antônio Pêgas Henriques. Ao Prof. Henriques por ter aberto as portas do laboratório, pela oportunidade e ensinamentos durante este trabalho. À Prof. Mariana, pelo apoio e a amizade ao longo do percurso, as palavras de incentivo e os abraços nos momentos mais difíceis, fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui.

Às colaboradoras do estudo, Prof. Júnia Capua e Prof. Sanna Sillankorva, por compartilhar conhecimentos, vivências, experiências e por sempre me fazer acreditar que tudo daria certo no final. Duas colegas maravilhosas, uma aqui pertinho, outra há milhares de quilômetros, não mediram esforços para apontar caminhos e sugerir possibilidades. Minha gratidão!

Aos colegas de mestrado e doutorado dos Laboratórios 206 e 208 (Bianca, Rafaele, Caroline Menti, Caroline Frozza, Francine, Camila, Giovana, Sandra e Daniela) pelo aprendizado durante os seminários e pelos chimarrões compartilhados. Aos alunos de iniciação científica dos Laboratórios (Keila, Sarah, Taila, Aline, Matheus) cujas atividades desenvolvidas nos laboratórios se faz de extrema importância, para garantir que o laboratório esteja sempre em ordem e funcionando. Aos colegas do bloco 57, sobretudo Dra. Flaviane Magrini e Prof. Suelen Paesi, sempre dispostas a colaborar com nosso trabalho.

Não posso deixar de agradecer à secretária do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Lucimara Serafini Rech, um anjo disposto em ajudar sempre que necessário.

Um agradecimento muito especial ao aluno de iniciação científica Wellington Vieira de Souza, por sua dedicação incondicional ao trabalho. Serei eternamente grata pela sua boa vontade e seu esforço, pelo ânimo em momentos críticos, pelo suporte em algumas noites e finais de semana de trabalho. Com você dividi preocupações, aflições e muito, MUITO trabalho. Por isso faço questão de compartilhar esta conquista, que também é sua!

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) por conceder uma bolsa sem a qual não seria possível a realização desta etapa acadêmica. À Universidade de Caxias do Sul (UCS) por toda a infraestrutura, seus recursos humanos e serviços destinados à educação e pesquisa.

Após agradecer aqueles que contribuíram cientificamente e tecnicamente para este trabalho, agradeço à família por toda a força emocional e por estarem ao meu lado em todos os momentos. Aos meus pais, Antônio e Izaura Alves, que me proporcionaram o acesso à educação e me prepararam para os desafios de vida. Vocês são os pilares da minha formação, acadêmica e como ser humano. Minhas irmãs Sandra, Raquel e Flávia, e meus sogros Luis Alberto e Rosa Maria Matozo: meu muito obrigada, de todo coração. Ao meu marido, Luciano Matozo, que esteve presente desde o princípio deste desafio da minha formação acadêmica, e, com apoio, paciência, carinho e palavras de incentivo, me impulsionou para que eu chegasse à etapa final do doutorado. E ao meu filho Augusto, eterna fonte de alegria e amor em minha vida.

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| LISTA DE TABELAS..... | 7 |
| LISTA DE FIGURAS..... | 8 |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 9 |
| RESUMO | 101 |
| ABSTRACT..... | 13 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 17 |
| 2.1 Gênero <i>Pseudomonas</i> | 17 |
| 2.2 <i>Pseudomonas cichorii</i> (Swingle, 1925) Stapp 1928..... | 19 |
| 2.3 Fitopatogenicidade da <i>Pseudomonas cichorii</i> | 23 |
| 2.4 Medidas de controle de <i>Pseudomonas cichorii</i> | 30 |
| 2.5 A descoberta dos bacteriófagos | 32 |
| 2.6 Bacteriófagos: definição, classificação e características | 35 |
| 2.7 Uso de fagos na terapia fágica e como biocontrole..... | 44 |
| 3. OBJETIVOS..... | 52 |
| 3.1 Objetivo geral | 52 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 52 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 53 |
| 4.1 Hospedeiro e condições de cultura..... | 53 |
| 4.2 Isolamento de fago, purificação e propagação | 53 |
| 4.3 Determinação da gama de hospedeiros..... | 55 |
| 4.4 Resistência térmica e sensibilidade ao pH..... | 56 |
| 4.5 Curva de crescimento de etapa única | 57 |
| 4.6 Estocagem a baixa temperatura..... | 58 |
| 4.7 Extração de DNA | 58 |
| 4.8 Análise da sequência do genoma | 60 |
| 4.9 Análise da atividade antimicrobiana do fago..... | 60 |
| 4.10 Análise estatística..... | 62 |
| 5. RESULTADOS | 63 |
| 5.1 Isolamento do fago | 63 |
| 5.2 Gama de hospedeiros..... | 64 |
| 5.3 Resistência térmica, sensibilidade ao pH e curva de crescimento de etapa única | 64 |
| 5.4 Estocagem a baixa temperatura..... | 66 |

| | |
|---|-----|
| 5.5 Caracterização do fago isolado..... | 67 |
| 5.6 Atividade antimicrobiana do fago..... | 72 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 77 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 91 |
| 8. PERSPECTIVAS..... | 93 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS..... | 94 |
| ANEXO I - FICHEIRO GENBANK..... | 126 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Divisões intragenéricas de espécies do gênero <i>Pseudomonas</i> | 18 |
| Tabela 2. Caracterização morfológica, bioquímica e fisiológica da bactéria <i>Pseudomonas cichorii</i> | 22 |
| Tabela 3. Doenças e gama de hospedeiros de <i>Pseudomonas cichorii</i> | 26 |
| Tabela 4. Sintomas causados por <i>Pseudomonas cichorii</i> nas diferentes partes das plantas. | 27 |
| Tabela 5. Classificação e propriedades básicas de bacteriófagos..... | 35 |
| Tabela 6. Propriedades dos fagos utilizadas na taxonomia (ICTV). | 37 |
| Tabela 7. Produtos à base de bacteriófagos utilizados na indústria de alimentos. | 48 |
| Tabela 8. Genes codificados pelo fago isolado. | 68 |
| Tabela 9. Classificação funcional das proteínas produzidas pelos genes do fago isolado. | 71 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Hierarquia taxonômica da bactéria <i>Pseudomonas cichorii</i> | 20 |
| Figura 2. Pigmento fluorescente difusível visível em cultivo de <i>Pseudomonas cichorii</i> em meio B de King. | 21 |
| Figura 3. Mapa de distribuição de <i>Pseudomonas cichorii</i> | 25 |
| Figura 4. Mancha-bacteriana-da-alface causada por <i>Pseudomonas cichorii</i> | 28 |
| Figura 5. Linha histórica da descoberta e utilização dos bacteriófagos na ciência | 34 |
| Figura 6. Exemplos de estruturas de fagos com cauda..... | 37 |
| Figura 7. Ciclo de vida lítico e lisogênico de bacteriófagos..... | 40 |
| Figura 8. Curva de crescimento de uma única etapa..... | 42 |
| Figura 9. Placas de lise (clareira circular) formadas pela infecção de um fago em camada de células bacterianas em ágar semissólido. | 43 |
| Figura 10. Isolamento de bacteriófagos. A) Punção em uma única placa de lise com auxílio de palito esterilizado. B) Linha pontilhada contendo fagos. C) Fita de papel filtro esterilizada sendo passada sobre a linha pontilhada com auxílio de uma pinça. D) Placas de lise formadas após o processo..... | 54 |
| Figura 11. Placas formadas por fago em cultivo de <i>Pseudomonas cichorii</i> em placa com dupla camada de ágar..... | 64 |
| Figura 12. Teste de sensibilidade térmica do fago. | 65 |
| Figura 13. Teste de estabilidade em pH..... | 65 |
| Figura 14. Curva de crescimento de etapa única | 66 |
| Figura 15. Teste de estocagem de fago a temperatura muito baixa (-20 °C), sob diferentes concentrações de glicerol. | 67 |
| Figura 16. Genoma do fago..... | 68 |
| Figura 17. Análise comparativa aos genomas dos fagos ΦPSA2, gh-1, KNP, WRT e ΦPsa17.72 | |
| Figura 18. Atividade antimicrobiana do fago PCMW57..... | 73 |
| Figura 19. Atividade antimicrobiana do fago PCMW57. | 73 |
| Figura 20. Atividade antibacteriana avaliada por método colorimétrico usando o Ensaio com Resazurina. | 74 |
| Figura 21. Atividade antimicrobiana do fago vB_Pci_PCMW57 sob diferentes MOI iniciais (0.1, 0.01, 0.001) e após diluição seriada do fago..... | 75 |
| Figura 22. Atividade antibacteriana avaliada através de método colorimétrico, usando resazurina. | 75 |

Figura 23. Atividade antimicrobiana do fago vB_Pci_PCMW57 sob diferentes MOI iniciais (1, 0.1, 0.01, 0.001).. 76

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|---|
| ATCC | <i>American type culture collection</i> – coleção americana de tipos de cultura |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DO | Densidade óptica |
| ELISA | <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> |
| EDTA | ácido etilenodiaminotetracético |
| GRAS | <i>Generally Recognized As Safe</i> ou geralmente são reconhecidos como seguros |
| LOPAT | Produção de Levana [L], oxidase [O], atividade pectinolítica [P], dihidrólise da arginina [A], reação de hipersensibilidade em folhas de tabaco [T] |
| MgSO ₄ | Sulfato de magnésio |
| MOI | Multiplicity of infection – Multiplicidade de infecção |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> ou Reação em Cadeia da Polimerase |
| PEG | Polietilenoglicol |
| PFU | <i>Plaque-forming unit</i> – UFP – unidades formadoras de placa |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| SDS | dodecíl sulfato de sódio |
| SM | Meio magnésio salino |
| TE | Tris-EDTA |
| TSB | Caldo triptona de soja |
| UFC | Unidade formadora de colônia; UFC – <i>Colony-forming unit</i> |
| °C | Graus Celsius |

RESUMO

Pseudomonas cichorii é uma fitobactéria Gram-negativa do solo, patogênica para uma ampla variedade de hospedeiros e que pertence ao complexo *Pseudomonas syringae*. Devido à sua baixa especificidade, sua gama de hospedeiros inclui alface, berinjela, aipo, cogumelos, tomate, café, trigo, soja, manjeriço, além de várias plantas ornamentais. Tendo como ambiente ideal de desenvolvimento áreas quentes e úmidas, a bactéria se espalha pela chuva, impulsionada pelo vento, ou durante a irrigação por aspersão e sistemas de irrigação suspensos, infectando as superfícies das folhas molhadas. Seu controle inclui uma série de intervenções preventivas de controle de umidade, além do uso de produtos à base de cobre ou bactericidas, nem sempre bem-sucedido na prevenção da disseminação da doença quando as condições são úmidas. No presente estudo, um novo bacteriófago virulento que infecta a fitobactéria *P. cichorii* foi isolado no Brasil a partir de uma mistura de vegetais folhosos (alface, chicória e repolho) que apresentavam sintomas visíveis de doenças bacterianas. O fago denominado PCMW57 reteve quase 100% da atividade de infecção após incubação por 60 minutos em temperaturas variando de 5 a 45 °C e resultou em drástica redução de título acima de 60 °C. Em relação ao pH, sua estabilidade máxima foi observada em pH 7,5, sendo estável na faixa de pH de 5,0 a 8,5. A curva de crescimento de uma etapa determinou que o período de tempo latente foi de aproximadamente 60 minutos e o tamanho do *burst* do fago foi de cerca de 151 partículas de fago por célula infectada. O fago mostrou habilidade de lisar a bactéria em teste de atividade antimicrobiana sob diferentes multiplicidades de infecção (MOI) (de 1 a 0,001). Quando testado em outras fitobactérias (*Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* sp. e *Pseudomonas fluorescens*), o fago não foi capaz de induzir a formação de placa de lise, apontando que nenhuma foi suscetível ao fago. O fago purificado mostrou-se viável quando

armazenado em glicerol em concentrações entre 10% a 30% (v/v), em temperatura de congelamento (-20 °C). O genoma de PCMW57 é uma molécula de DNA dupla-fita linear de 40.117 pares de base de comprimento e contém 49 *Open reading frame* (ORF ou Fase de leitura aberta). O fago é geneticamente semelhante a outros fagos de *Pseudomonas*, compartilhando homologia acima de 90% com WRT (94,6%), ΦPSA2 (92,7%), ΦPsa17 (92,3%) e vírus KNP (91,7%) e de 85,1% com o fago gh-1. Os resultados apontam que o fago isolado tem alto potencial como agente de biocontrole eficaz de *P. cichorii*. Até onde sabemos, este é o primeiro relato de um bacteriófago infectando *P. cichorii*.

Palavras-chave: *Pseudomonas cichorii*; Bacteriófagos; Fitobactéria; Vegetais Folhosos.

ABSTRACT

Pseudomonas cichorii is a Gram-negative soil phyto bacterium, pathogenic to a wide variety of hosts and belonging to the *Pseudomonas syringae* complex. Due to its low specificity, its host range includes lettuce, eggplant, celery, mushrooms, tomatoes, coffee, wheat, soy, basil, as well as several ornamental plants. With the ideal environment for developing hot and humid areas, the bacteria spreads through rain, driven by the wind, or during sprinkler irrigation and suspended irrigation systems, infecting the surfaces of wet leaves. Its control includes a series of preventive humidity control interventions, in addition to the use of copper-based products or bactericides, which are not always successful in preventing the spread of the disease when conditions are wet. In the present study, a new virulent bacteriophage that infects phyto bacteria *P. cichorii* was isolated in Brazil from leafy vegetables (lettuce, chicory and cabbage) that showed visible symptoms of bacterial diseases. The PCMW57 phage retained almost 100% of the infection activity after incubation for 60 minutes at temperatures ranging from 5 to 45 °C, and led a drastic reduction in titer above 60 °C. Its maximum stability was observed at pH 7.5, being stable in the pH range of 5.0 to 8.5. The one-step growth curve determined that the latent time period was approximately 60 minutes and the size of the phage burst was about 151 phage particles per infected cell. The phage showed the ability to lyse the bacteria in an antimicrobial activity test under different multiplicities of infection (MOI) (from 1 to 0.001). When tested on other phyto bacteria, the phage was not able to induce the formation of lysis plaque, pointing out that none was susceptible to the phage. The purified phage proved to be viable when stored in glycerol in concentrations between 10% to 30% (v / v), at freezing temperature (-20 °C). PCMW57 genome is a linear double-stranded DNA molecule of 40,117 base pairs in length and contains 49 Open reading frame (ORF). The phage is genetically

similar to other *Pseudomonas* phages, sharing homology above 90% with WRT (94.6%), Φ PSA2 (92.7%), Φ Psa17 (92.3%) and KNP virus (91.7%) and 85.1% with the gh-1 phage, all belonging to the T7-virus genus. The results indicate that the isolated phage has high potential as an effective biocontrol agent for *P. cichorii*. As far as we know, this is the first report of a bacteriophage infecting *P. cichorii*.

Keywords: *Pseudomonas cichorii*; Bacteriophages; Phytobacteria; Leafy Vegetables.

1. INTRODUÇÃO

As bactérias são hospedeiras de um grupo especial de vírus denominados bacteriófagos ou simplesmente fagos. São considerados o grupo mais abundante de entidades biológicas no planeta e têm sido valiosos como modelos para a compreensão dos princípios fundamentais da biologia molecular. Grande parte das pesquisas genéticas foi realizada com bacteriófagos como sistemas-modelo.

De um modo geral, os fagos também têm sido utilizados como agentes de controle biológico. Neste contexto, com grande potencial para controlar vários patógenos de origem alimentar, têm sido sugeridos como conservantes naturais de alimentos, uma alternativa para conservantes alimentares convencionais. Na biopreservação de alimentos, a aplicação de bacteriófagos líticos pode controlar seletivamente populações de interesse, através da inativação de bactérias presentes em superfícies de contato com alimentos, sem interferir com a microbiota alimentar remanescente.

Com base na falta de toxicidade e efeitos prejudiciais para a saúde humana, os fagos geralmente são reconhecidos como seguros (GRAS ou *Generally Recognized As Safe*), podendo, deste modo, ser empregados em alimentos como as hortaliças, cuja perecibilidade impossibilita o armazenamento por longos períodos de tempo, acarretando perdas de quantidade e qualidade.

Dentre as bactérias responsáveis por diferentes quadros sintomatológicos no grupo das hortaliças está *Pseudomonas cichorii*. Pertencente ao gênero *Pseudomonas*, grupo de bactérias mais diversificado e ecologicamente significativo do planeta, *P. cichorii* se destaca pela ampla distribuição e variedade de hospedeiros, podendo causar sérios prejuízos econômicos.

A principal medida de controle de *P. cichorii* é a prevenção da contaminação da cultura, o que envolve controle rigoroso da água para plantio, escolha de sementes de qualidade, remoção rápida de plantas infectadas, pulverização com fungicidas cúpricos e rotação de culturas com plantas não hospedeiras. O controle, portanto, deve ser integrado, ou seja, conduzido pela combinação de várias medidas, uma vez que as fitobacterioses são de difícil controle e inúmeros problemas estão relacionados à baixa eficácia do controle químico.

Em 2006 surgiu o primeiro produto fágico nos Estados Unidos da América (EUA) relacionado à segurança alimentar aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA). A Empresa norte americana Intralytix lançou diferentes coquetéis de fagos, utilizados no controle de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Shigella* spp. e *Escherichia coli*. No entanto, trata-se de uma tecnologia em desenvolvimento, com desafios a serem superados, a exemplo de métodos de produção de bacteriófagos, de modo que possam ser usados no controle de bactérias patogênicas.

Considerando o reduzido número de produtos agroquímicos e/ou antibióticos para controle da maioria das doenças bacterianas em hortaliças e em outras culturas, bem como os aspectos de toxicidade e desenvolvimento de resistência bacteriana a estes produtos, e, ainda, avaliando os bacteriófagos como promissores na biopreservação de alimentos, o objetivo do presente estudo foi isolar, caracterizar e avaliar o efeito de bacteriófago para biocontrole de *Pseudomonas cichorii*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Gênero *Pseudomonas*

O nome *Pseudomonas* foi proposto como denominação para um novo gênero pelo professor Migula, do Instituto Karlsruhe, na Alemanha, ainda no final do período século XIX. O gênero foi assim denominado pela semelhança das células com as dos monas nanoflagelados, tanto em tamanho quanto em motilidade ativa. A intenção principal de Migula pode ter sido chamar a bactéria de 'falso Monas', esclarecendo que a etimologia do nome não foi traçada diretamente de palavras gregas que significariam 'unidades falsas' ('Gr. *Pseudes* falso; Gr. *monas* unidades, monas) (Palleroni, 2010). Embora a sua descrição do novo gênero tenha sido imprecisa, foi aceita para publicação (Migula, 1894) e teve seu nome conservado.

Pseudomonas aeróbicas constituem uma grande e diversa gama de bactérias. Stanier *et al.* (1966) fizeram a primeira descrição taxonômica de *Pseudomonas*, de acordo com suas características bioquímicas, fisiológicas e nutricionais, definindo-as como microrganismos unicelulares, retos ou levemente curvados, móveis por um ou mais flagelos polares, Gram-negativos, não formadores de esporos, aeróbios e possuem mecanismo energético respiratório.

O gênero *Pseudomonas* engloba o grupo de bactérias mais diversificado e ecologicamente significativo do planeta (Spiers *et al.*, 2000). Onipresentes na natureza, as bactérias *Pseudomonas* possuem habilidades metabólicas variáveis que lhes permitem utilizar uma ampla gama de compostos orgânicos, sendo importantes como patógenos de animais e plantas (Yamamoto *et al.*, 2000).

Fliigge (1886) reconheceu dois biótipos de *Pseudomonas* distinguíveis no caráter de liquefação de gelatina, que levaram os nomes de *Pseudomonas putida* (não liquefação) e *Pseudomonas fluorescens* (liquefação). Desde então, muitas outras espécies de *Pseudomonas* foram descritas. No grupo das *Pseudomonas* não fluorescentes, encontram-se as espécies *P. caricapapayae* e *P. corrugata*. Já no grupo das *Pseudomonas* fluorescentes, encontram-se as espécies *P. aeruginosa*, *P. cichorii*, *P. fuscovaginae*, *P. marginalis*, *P. putida*, *P. savastanoi* e *P. syringae*.

O subgrupo mais amplamente estudado de *Pseudomonas* aeróbicas consiste nas *Pseudomonas* fluorescentes, habitantes comuns do solo e da água, caracterizadas principalmente por sua capacidade de produzir pigmentos fluorescentes verde-amarelo. A identificação das espécies fitopatogênicas do gênero *Pseudomonas* é principalmente baseada nos testes LOPAT (Produção de Levana [L], oxidase [O], atividade pectinolítica [P], dihidrólise da arginina [A], reação de hipersensibilidade em folhas de tabaco [T]) (Schaad *et al.* 2001).

Yamamoto *et al.* (2000) realizaram análise filogenética do gênero *Pseudomonas* utilizando as sequências nucleotídicas dos genes *gyrB* (DNA-girase subunidade B) e *rpoD* (Fator σ^{70}). A parte desta análise, foram reconhecidos dois principais aglomerados genéricos, apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Divisões intragenéricas de espécies do gênero *Pseudomonas*.

| Cluster | Características gerais | Representantes |
|---------|--|--|
| I | Um único flagelo polar; faixa mais alta de conteúdo de GC (60,6-66,3 mol%); crescimento a 41 °C ¹ ; não produção de pigmentos fluorescentes ² | <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. alcaligenes</i> , <i>P. balearica</i> , <i>P. citronellolis</i> , <i>P. mendocina</i> , <i>P. oleovorans</i> , <i>P. pseudoalcaligenes</i> , <i>P. straminea</i> , <i>P. stutzeri</i> . |
| II | Mais de um flagelo polar; faixa mais baixa de conteúdo de GC (59,0-63,6 mol%); | Complexo <i>P. putida</i> : <i>P. putida</i> , <i>P. fulva</i> . |

incapacidade de crescer a 41 °C;
algumas cepas crescerem a 4 °C;
produção de pigmentos fluorescentes
pela maioria das cepas (Palleroni,
1984).

Três grupos monofiléticos distintos,
denominados de “complexos”

Complexo *P. syringae*:
P. amygdali, *P. caricapapayae*,
P. cichorii, *P. ficuserectae*,
P. viridiflava, patovares de
P. savastanoi, patovares de
P. syringae.

Complexo *P. fluorescens*:
P. azotoformans, *P. marginalis*
pathovars, *P. mucidolens*,
P. synxantha, *P. tolaasii*,
P. chlororaphis, *P. agarici*,
P. asplenii, *P. corrugata*,
P. fluorescens (biótipos B e G),
P. putida B.

Legenda: 1 – Exceto *P. straminea* (sem crescimento a 37 ° C); 2 – Exceto *P. aeruginosa* e *P. straminea*
Fonte: adaptado de Yamamoto *et al.* (2000); Palleroni, 1984.

2.2 *Pseudomonas cichorii* (Swingle, 1925) Stapp 1928

Foi a partir da chicória (*Cichorium endivia*), planta hospedeira na qual *P. cichorii* causa cretamento bacteriano, que se originou o nome da espécie dessa bactéria (Colariccio & Chaves, 2017). *P. cichorii* é uma bactéria Gram-negativa, bastonetiforme, com cerca de 0,8-1,3 µm, que forma colônias lisas de 2 mm de diâmetro, ligeiramente salientes, circular, com margens ligeiramente irregulares e de cor esbranquiçadas/palha (Kimati *et al.*, 1995; Anjos, 2012). Tem capacidade de crescer em amplo espectro de temperatura (5 °C a 35 °C) (Lopes, 2010). A hierarquia taxonômica da bactéria *P. cichorii* está apresentada na **Figura 1**.

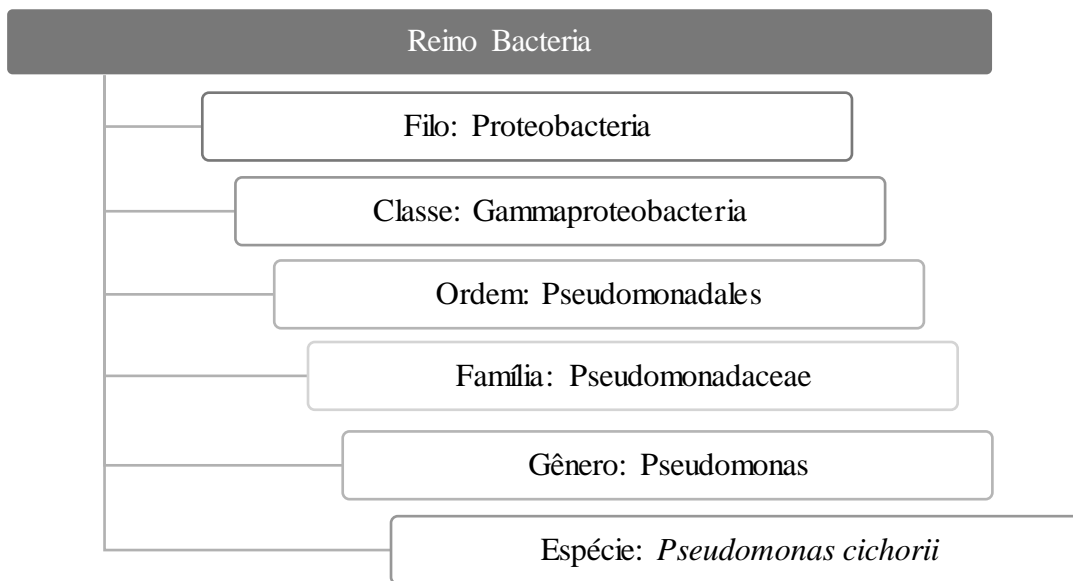


Figura 1. Hierarquia taxonômica da bactéria *Pseudomonas cichorii* (Fonte: ITIS Report, 2020).

Dentre outros nomes taxonômicos que já foram publicados como sinônimos para *P. cichorii* estão *Phytomonas cichorii*, *Bacterium cichorii*, *Chlorobacter cichorii* e *Pseudomonas papaveris*. Entretanto, estes nomes não foram publicados de forma válida de acordo com as regras do Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias (Código Bacteriológico). De acordo com a *Approved List of Bacterial Names* (Skerman et al., 1980), o nome definitivo é *Pseudomonas cichorii* e seu número de identificação de taxonomia (*taxonomy ID*) é 36746 (NCBI, 2020) ou TSN (*Taxonomic Serial Number*) 965283 (ITIS, 2020).

P. cichorii, filogeneticamente, pertence ao complexo *Pseudomonas syringae*, atualmente subdividida em mais de 50 patovares, entre eles *P. amygdali*, *P. caricapapayae*, *P. ficuserectae*, *P. savastanoi* e *P. viridiflava* (Palleroni, 1984; Yamamoto *et al.*, 2000). Os patovares do complexo *P. syringae* têm grande impacto na produção de alimentos e meio ambiente, cujos surtos são frequentemente devastadores. Conseqüentemente, há o impacto econômico das doenças causadas pelos patovares, que atacam diversas espécies hospedeiras, não só comestíveis, mas também ornamentais

(Mansfield *et al.*, 2012). No que diz respeito à *P. cichorii*, estudos revelaram alta diversidade genética entre as cepas isoladas de várias plantas hospedeiras em diferentes áreas geográficas (Trantas *et al.*, 2013; Timilsina *et al.*, 2017), no entanto, todas podem causar doença entre uma variedade de hospedeiros, incluindo alface, aipo, crisântemo e outros (Tantras *et al.*, 2013).

Uma vez que os sintomas induzidos por *P. cichorii* têm sido relatados como mancha foliar, ferrugem e podridão, e variam dependendo do hospedeiro e da parte infectada da planta, estes podem ser confundidos com aqueles causados por outros patógenos bacterianos, sendo a confirmação do patógeno essencial para uma gestão adequada. Deste modo, com base nas características fenotípicas, as espécies do gênero *Pseudomonas* do Grupo I DNA-rRNA são divididas em dois grupos distintos, segundo suas propriedades de produzir pigmentos fluorescentes (pioverdinas) ou de acumular nas células inclusões de poli-a-hidroxibutirato (não-fluorescentes) (Kimura & Ribeiro, 1994). *P. cichorii* pertence a este grupo e produz pigmento verde-amarelado, fluorescente, sendo fácil a observação em meio King-B (**Figura 2**).



Figura 2. Pigmento fluorescente difusível visível em cultivo de *Pseudomonas cichorii* em meio B de King.
Fonte: autoral.

O diagnóstico presuntivo do patógeno pode ser feito com os testes LOPAT, uma vez que *P. cichorii* difere da espécie *P. syringae* pelos critérios morfológicos, bioquímicos e fisiológicos, sendo classificada no Grupo LOPAT III (- + - - +) (**Tabela 2**) (Wilkie & Dye, 1973; Schaad et al., 2001).

Tabela 2. Caracterização morfológica, bioquímica e fisiológica da bactéria *Pseudomonas cichorii*.

| Características | <i>P. cichorii</i> |
|---|---------------------------|
| Morfologia | Bastonete |
| Coloração de Gram | Gram-negativo |
| Solubilidade em hidróxido de potássio (KOH) | + |
| Coloração de colônia em meio B de King (BK) | Branca |
| Pigmento fluorescente em meio B de King (BK) | + |
| Aerobiose | Aeróbica restrita |
| Hidrólise de gelatina | - |
| Colônias mucoide em meio YDC a 30 °C | - |
| Testes LOPAT | |
| Levan | - |
| Oxidase | + |
| Podridão em discos de batata | - |
| Arginina dihidrolase | - |
| Reação de hipersensibilidade em folhas de fumo | + |
| Produção de ácido a partir de carboidratos | |
| Citrato | + |
| D-arabinose | - |
| D-celobiose | - |
| D-tartarato | + |
| D-trealose | - |
| Glicerol | + |
| Gluconato | + |
| L tartarato | + |
| Manitol | + |
| Oxalato | - |
| Rafinose | - |
| Ramnose | + |
| Sacarose | - |
| Salicina | - |
| Succinato | + |
| Redução de nitrato | - |
| Nucleação de gelo | - |

Produção de ácido indol acético

-

Fonte: Wilkie; Dye, 1974; Schaad *et al.* (2001); Silva Júnior *et al.* (2009). Meio YDC: carbonato de cálcio, dextrose, extrato de levedura. + reação positiva; - reação negativa.

Métodos moleculares altamente específicos e sensíveis devem ser usados para confirmar a identidade do patógeno. A identificação pode ser feita através de PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou Reação em Cadeia da Polimerase) em tempo real, utilizando *primers* específicos, desenhados a partir de genes conservados *hrcRST* e *hrp*, os quais correspondem a região de resposta de hipersensibilidade e patogenicidade de *P. cichorii* (Hojo *et al.*, 2008; Cottyn *et al.*, 2011). A análise da sequência 16S rRNA confirma que *P. cichorii* pertence ao “grupo *P. syringae*” (Anzai *et al.*, 2000) e ao “*P. syringae* subgrupo” de Palleroni rRNA Grupo I com base nas análises de hibridização rRNA-DNA (Palleroni, 1984). A detecção específica de *P. cichorii* também pode ser feita através de meios seletivos contendo inibidores fúngicos e bacterianos (Jones *et al.*, 1990), imunofluorescência e teste ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (Ogiso *et al.*, 1997).

2.3 Fitopatogenicidade da *Pseudomonas cichorii*

A fitobactéria *P. cichorii* é um importante patógeno vegetal, causador de doenças em uma ampla gama de espécies, incluindo hospedeiros de importância econômica como o tomate (Mirik *et al.*, 2011; Silva Júnior *et al.*, 2009; Trantas *et al.*, 2013; Timilsina *et al.*, 2017), alface (Cottyn *et al.*, 2009; Mirik *et al.*, 2011), chicória (Zhang & Fu, 2013), melão, melancia (Obradovic & Arsenijevic, 2002) e plantas ornamentais (Garibaldi *et al.*, 2009; Marques *et al.*, 2016; Mirik *et al.*, 2011). Deste modo, *P. cichorii* se destaca pela ampla distribuição, variedade de hospedeiros e baixa especificidade (Marques *et al.*, 2016).

Em condições climáticas favoráveis para a sua manifestação, pode causar sérios prejuízos (Beriam, 2011). As fontes de inóculo são provavelmente os solos contaminados, restos de plantas infectadas e a presença de hospedeiros alternativos. A bactéria sobrevive no solo, sendo disseminada por respingos de água e por chuvas com ventos, penetrando na planta por ferimentos ocasionados por insetos, pelo frio ou pela queima por adubos e por aberturas naturais (Kimari, 1997; Beriam & Almeida, 2017). Sementes infectadas também podem ser fontes de inóculo (Colariccio & Chaves, 2017). A transmissão vetorial através dos insetos pode ocorrer, por exemplo, através de indivíduos adultos de *Liriomyza trifolii* (mosca-minadora), que são capazes de adquirir e transmitir *P. cichorii* (Broadbent & Matteoni, 1991). Entretanto, feridas não são necessárias para a infecção da maioria dos hospedeiros quando as plantas estão sujeitas a altos níveis de umidade livre, e, nestas condições ambientais, a infecção pode se dar por meio de pelos epidérmicos (Shirata *et al.*, 1982).

O patógeno da podridão central da alface, *P. cichorii* SF1-54, produz sete compostos bioativos com propriedades biossurfactante, sendo que dois compostos, denominados cichopectina A e B, exibiram atividade indutora de necrose em folhas de chicória (Huang *et al.*, 2015). *P. cichorii* não produz pectato-liase (poligalacturonato liase), enzima mais importante para degradar as paredes celulares das plantas. Alternativamente, a infecção por *P. cichorii* causa condensação de heterocromatina e degradação do DNA em células de alface, seguido por morte celular induzida, o que resulta em sintomas da doença (Hikichi *et al.*, 2013).

Embora haja relatos da transmissão de *P. cichorii* via semente, não há dados experimentais sobre esta forma de transmissão. Ohata *et al.* (1982) mostraram que *P. cichorii* pode ser isolado de sementes de alface embebidas em suspensão bacteriana e armazenadas a 23 °C ou 5 °C após 50 e 93 dias, respectivamente.

P. cichorii está amplamente distribuída, sendo relatada em países como Argentina (Alippi *et al.*, 2002), Brasil (Maringoni *et al.*, 2003; Silva Júnior *et al.*, 2009), China (Lee *et al.*, 2014), Japão (Inoue *et al.*, 2013), Itália (Garibaldi *et al.*, 2005; Garibaldi *et al.*, 2009), Portugal (Ferreira-Pinto & Oliveira, 1993), Espanha (Cambra *et al.*, 2004), Coreia do Sul (Yu & Lee, 2012), Turquia (Aysan *et al.*, 2009), Estados Unidos (Zhang & Fu, 2013), entre outros. O mapa de distribuição de *P. cichorii* no mundo (**Figura 3**) mostra que *P. cichorii* é provavelmente onipresente, sendo comum na África do Sul, Alemanha, Barbados, Brasil, Cuba, Estados Unidos, França, Itália, Japão, Nova Zelândia, Reino Unido, Rússia, Taiwan e Tanzânia.



Figura 3. Mapa de distribuição de *Pseudomonas cichorii*. Fonte: CAB International, 2020.

Citada pela primeira vez em 1925 (Swingle, 1925) em chicória, muitos outros hospedeiros passaram a ser reportados, especialmente hortaliças como endívia (Stapp, 1935), alface (Stapp, 1935; Freire, 1954), repolho (Smith, Ramsey, 1956), salsão (Thayler & Wehlburg, 1965) e couve-flor (Coleno *et al.*, 1971). Apesar de ser conhecida como “praga bacteriana da endívia”, a bactéria apresenta uma série de

hospedeiros vegetais comestíveis, como aipo (Pernezny *et al.*, 1994), quiabo (Mariano *et al.*, 1994), alho (Stefanova *et al.*, 1992), cenoura peruana (Beriam *et al.*, 1998), repolho chinês (Sun *et al.*, 1993), soja (Nishiyama *et al.*, 1986), manjeriço tailandês (Luiz *et al.*, 2018), cúrcuma (Maringoni *et al.*, 2003), melão e melancia (Obradovic, Arsenijevic, 2002).

Na Califórnia, entre os anos de 1974 e 1975, a infecção resultou na perda parcial ou total do cultivo em pelo menos 80 hectares (Grogan *et al.*, 1997). Na Itália, uma epidemia na qual 50-60% das plantas de alface (cultivar Kagraner) foram infectados foi descrita em 1979, por Bazzi & Mazzucchi (1979). Em Portugal durante o inverno 1991-92, cultivares de alface produzidas em estufa foram fortemente infestadas e a produção foi parcial ou totalmente perdida (Ferreira-Pinto & Oliveira, 1993).

Nos últimos cinco anos, diversos autores relataram a presença da bactéria em locais como China (She *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2019; Ruan *et al.*, 2019), Havaí (Sugiyama *et al.*, 2018; Luiz *et al.*, 2018), Tennessee (Newberry *et al.*, 2016), New Jersey (Patela *et al.*, 2019), Tanzânia (Testen *et al.*, 2015), Indiana (Webb *et al.*, 2016). No Brasil, *P. cichorii* foi relacionada em mais de 40 espécies botânicas, algumas citadas na **Tabela 3**. Dentre as hortaliças, são consideradas hospedeiros para *P. cichorii*, alface, cebola, cenoura, chicória, couve, couve-flor, pimentão, quiabo, repolho e tomate (Beriam, 2007).

Tabela 3. Doenças e gama de hospedeiros de *Pseudomonas cichorii*.

| Doença | Hospedeiro | Referencia |
|------------------------|-------------------------------|---|
| Colo preto | Alface (hidroponia) | Colariccio; Chaves (2017) |
| Crestamento bacteriano | Alface (plantio convencional) | Colariccio; Chaves (2017) |
| Crestamento bacteriano | Cafeeiro (folhas) | Robbs <i>et al.</i> (1974); Beriam <i>et al.</i> (2017) |
| Crestamento bacteriano | Calêndula | Beriam <i>et al.</i> (2001) |
| Crestamento bacteriano | Gérbera | Marques <i>et al.</i> (2018) |
| Crestamento bacteriano | Girassol (folhas) | Robbs <i>et al.</i> (1981) |
| Crestamento bacteriano | Filodendro | Maltavolta Júnior <i>et al.</i> (2001) |
| Mancha bacteriana | Almeirão | Anjos <i>et al.</i> (2012) |
| Mancha bacteriana | Mandioquinha-salsa (folha) | Beriam <i>et al.</i> (1998) |
| Mancha cerosa | Alface (plantio convencional) | Lopes <i>et al.</i> (2010) |
| Queima bacteriana | Tomateiro (folhas) | Silva Júnior <i>et al.</i> (2009) |

Os sintomas causados por *P. cichorii* variam dependendo do hospedeiro e da parte infectada da planta. O tamanho das lesões varia de acordo com as condições ambientais: em condições de umidade alta, lesões maiores e apodrecimento dos tecidos infectados são observados; em condições de umidade baixa as lesões podem ter poucos milímetros de diâmetro e a doença pode eventualmente parar de se desenvolver (Osdaghi, 2020). A **Tabela 4** apresenta uma lista de sintomas ou sinais característicos causados por *P. cichorii*.

Tabela 4. Sintomas causados por *Pseudomonas cichorii* nas diferentes partes das plantas.

| Parte da planta | Sintoma | Referências |
|-----------------|-------------------------|--|
| Inflorescência | necrose | McFadden, 1961 |
| | | Strider and Jones, 1977; Engelhard <i>et al.</i> , 1983 Semer & Raju, 1984 |
| Folhas | cores anormais | McFadden, 1961 |
| | queda anormal de folhas | Wilkie & Dye, 1974 |
| | áreas necróticas | Ferreira-Pinto & Oliveira, 1993 |
| Caules | descoloração da casca | McFadden, 1961 |
| | | Wilkie & Dye, 1974; Piening & McPherson, 1985 |
| Hastes | descoloração interna | Wilkie & Dye, 1974 |
| | | Rivera <i>et al.</i> , 1981 |
| | | Trantas <i>et al.</i> , 2013 |
| Planta inteira | morte | Jones <i>et al.</i> , 1983 Chase, 1987 |

Fonte: autoral.

Grogan *et al.* (1997) denominaram de '*varnish spot*' a doença destrutiva de cabeças maduras de alface que ocorreu na Califórnia. A doença foi caracterizada por manchas necróticas de poucos milímetros de diâmetro, brilhantes, firmes e de cor marrom-escuro, que ocorre nas lâminas ou pecíolos de folhas da segunda ou terceira camada de folhas mais externa.

Em alface, pequenas manchas necróticas escuras brilhantes e firmes aparecem nas folhas internas, principalmente ao longo das nervuras (Lopes, Duval, 1998). A

'mancha-cerosa' apresenta como sintomas manchas necróticas marrom-escuras brilhantes e firmes, não amolecidas, principalmente ao longo das nervuras nas folhas internas na forma de pequenas manchas (Lopes *et al.*, 2010). A 'mancha-bacteriana' é uma doença de ocorrência restrita, associadas a temperaturas amenas (na faixa entre 18 °C e 25 °C) e alta umidade relativa (Kobori, 2011) (**Figura 4**).



Figura 4. Mancha-bacteriana-da-alface causada por *Pseudomonas cichorii*. Fonte: Lima, 2016.

O crestamento bacteriano da alface é caracterizado por manchas irregulares, de coloração marrom escura, no interior do limbo foliar, e de forma mais ou menos triangular quando avançam a partir dos bordos. Em condições de alta umidade, as folhas mais novas também são atacadas. Quando há coalescência de lesões, os bordos ficam queimados, de cor escura e o tecido apresenta-se flácido e podre (Beriam & Almeida, 2017). No aipo, o crestamento bacteriano causado por *P. cichorii* é caracterizado por lesões nas folhas, caule e pecíolo. Nas folhas, as lesões são inicialmente circulares a angulares, verdes escuras, manchas encharcadas de água com diâmetro de 1-2 mm. No caule e no pecíolo, os sintomas aparecem como lesões alongadas, marrom-enferrujadas,

com 1-2 mm de largura por 2-5 mm de comprimento (Wilkie & Dye, 1974; Pernezny *et al.*, 1994).

Segundo Kiba *et al.* (2006), *P. cichorii* é o principal agente causal da doença bacteriana conhecida por 'podridão da alface', uma doença economicamente importante em todo o mundo, uma vez que pode afetar uma ampla variedade de plantas, tanto na cultura, quanto no armazenamento. Em folhas de alface, *P. cichorii* invade os espaços intercelulares através dos estômatos e cresce vigorosamente, causando apodrecimento nas folhas (Hikichi *et al.*, 2013). A 'podridão ou mancha de verniz' na alface cultivada no campo é chamada de 'podridão da nervura central' quando infecta plantas de alface cultivadas em estufa. Os sintomas consistem em pequenas manchas marrons que coalescem e se expandem em lesões úmidas de marrom escuro a preto esverdeado ao longo da nervura central das folhas da cabeça interna (Cottyn *et al.*, 2009; Cottyn *et al.*, 2011).

No tomateiro, a doença denominada 'necrose da medula' do tomate tem como sintomas iniciais o amarelecimento e murchamento das folhas jovens quando infecta a parte interna do caule, enquanto a infecção grave pode levar de verde escuro a marrom escuro, manchas irregulares nas lâminas das folhas e estrias alongadas ao longo do caule (Wilkie & Dye, 1974).

Em plantas ornamentais, os sintomas variam entre as espécies. No crisântemo, lesões necróticas irregulares de marrom escuro a preto se desenvolvem nas folhas (mancha foliar), enquanto causa uma necrose do caule marrom-escuro (ferrugem). Na ferrugem dos botões, os botões das flores tornam-se castanhos escuros e morrem prematuramente (McFadden, 1961). Na 'necrose do caule' no crisântemo, os sintomas são lesões azul-escuras a pretas, encharcadas de água ao longo do caule, sem lesões nas folhas (Jones *et al.*, 1983). No gerânio, manchas de formato irregular, encharcadas de

água, que se tornam marrom escuro a preto caracterizam a doença denominada 'mancha foliar do gerânio' (Engelhard *et al.*, 1983).

Na gérbera, manchas circulares a irregulares, marrom-escuras com ou sem anel concêntrico se estendem das margens tornam-se estreitas à medida que alcançam a veia média (Miller & Knauss, 1973). No *Hibiscus rosa-sinensis*, os sintomas consistem em manchas castanhas com margens roxas ou pretas (Chase, 1986).

2.4 Medidas de controle de *Pseudomonas cichorii*

O principal problema das fitobacterioses é o controle, que deve ser conduzido pela combinação de várias medidas – o “controle integrado”. A dificuldade encontra-se relacionada à baixa eficácia do controle químico bem como ao baixo número de agroquímicos registrados para as diferentes culturas (Beriam, 2007). Por sobreviver no solo, o controle das doenças causadas por *P. cichorii* é difícil e deve se concentrar na prevenção da combinação de alta umidade, alta temperatura, alta densidade de plantas e uso de cultivares muito suscetíveis (Janse, 2008).

A disseminação e a severidade das doenças causadas por *P. cichorii* são favorecidas pela irrigação por aspersão e adensamento de plantas, uma vez que a doença pode originar-se em restos culturais de plantas infectadas, solo infestado ou a partir de outras hospedeiras presentes na lavoura ou nos arredores (Lopes *et al.*, 2010). Ohata *et al.* (1982) mostraram que a bactéria permaneceu viável em solo infestado por 30 dias durante o verão, e foi isolada do tecido doente enterrado por até seis meses.

A água é um dos principais fatores envolvidos na disseminação e expressão de sintomas causados por fitobactérias. Uma das principais medidas de controle para *P. cichorii* envolvem a escolha da área para o plantio, dando preferência para terrenos bem drenados, utilização de sementes de boa qualidade e sanidade. A remoção de folhas

infectadas durante a colheita pode diminuir os danos em pós-colheita, durante o trânsito, estocagem ou tempo de prateleira (Beriam, 2007; Beriam & Almeida, 2017).

As recomendações para o controle de *P. cichorii* incluem rotações de culturas deixando um intervalo de três anos entre as culturas suscetíveis e a aplicação de um produto de cobre um mês antes da colheita (Bazzi & Mazzucchi, 1979). Outras medidas de controle incluem: evitar plantios muito densos, para permitir boa aeração da lavoura; evitar excesso de água na irrigação ou alagamento do solo; pulverizar preventivamente com fungicidas cúpricos; e fazer rotação de culturas, de preferência com gramíneas (plantas não hospedeiras), por pelo menos um ano (Lopes *et al.*, 2010).

Estudos têm testado a influência da luz nos processos fisiológicos dos organismos e na interação planta e patógeno. Rajalingam & Lee (2015) demonstraram que plantas de tomate cultivadas sob luz verde e luz vermelha suprimem o desenvolvimento e a gravidade da doença causada por *P. cichorii* JBC1, ao regular a expressão gênica relacionada à defesa. Em estudo posterior, os autores mostraram que a expressão de genes para a produção de lipopeptídeos fitotóxicos e sideróforos foi significativamente reduzida pela luz verde, sugerindo que a luz verde percebida por *P. cichorii* JBC1 desempenha um papel fundamental em diversas respostas fisiológicas que podem afetar a sobrevivência epifítica do patógeno (Rajalingam & Lee, 2018).

Antibióticos quando aplicados preventivamente são mais eficientes do que quando a doença já está instalada no campo. Entretanto, a utilização repetida e frequente do mesmo antibiótico leva ao surgimento de bactérias resistentes aos princípios ativos (Beriam, 2007). Deste modo, a mais importante medida de controle é a prevenção da contaminação da cultura. Neste contexto, as perspectivas de estudos de bacteriófagos com potencial para aplicação em alimentos como agentes de biocontrole e biopreservativos são otimistas.

2.5 A descoberta dos bacteriófagos

Os bacteriófagos são provavelmente os organismos mais antigos e mais onipresentes na Terra, datando de 3 bilhões de anos (Sulakvelidze, 2011). De acordo com Abedon *et al.* (2011), há referências reais ou presuntivas de "bacteriófagos" na literatura datadas entre os anos de 1895 e 1917, sendo uma delas o estudo de Hankin, em 1896, de uma ação bactericida associada às águas dos rios Ganges e Yamuna, na Índia. Ou seja, aproximadamente 20 anos antes da “descoberta” real de bacteriófagos, por isso, não foram feitas alegações quanto a uma possível natureza fágica do fenômeno.

Foi justamente o efeito bacteriolítico dos fagos que levou à sua descoberta por Frederick Twort em 1915, em Londres (Twort *et al.*, 1915). No entanto, Twort não perseguiu esse achado: embora descrevesse um fenômeno denominado “transformação vítrea” (de colônias bacterianas em ágar) e “lise transmissível” causada por bacteriófagos em suas culturas, não conseguiu interpretar suas observações de uma maneira que englobava o conceito de vírus, de parasitismo intracelular ou de reprodução em série de um agente infeccioso (Summers, 2016). Foram mais dois anos antes que os bacteriófagos fossem “redescobertos” e oficialmente descritos por Felix d'Herelle. Em 1915, a partir de amostras fecais de doentes em convalescença de disenteria hemorrágica, D'Harelle obteve um filtrado livre de bactérias que posteriormente incubou juntamente com culturas bacterianas de *Shigella* spp., resultando na observação de fenômeno idêntico ao que havia sido descrito por Twort, ao qual deu o nome *taches vierges* (manchas em branco) ou placas de lise (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

A partir das observações de Hankin e Twort e da descrição de d'Herelle, os bacteriófagos passaram a ser cada vez mais reconhecidos e utilizados no combate a bactérias patogênicas humanas. Em 1920, os fagos começaram a ser usados amplamente na tipagem de espécies bacterianas de interesse médico (Knipe & Howley, 2007).

Em 1928, Alexander Fleming, por acaso, descobriu o primeiro antibiótico da história, a penicilina (Fleming, 1929), mas foi somente a partir de 1940 que os antibióticos desbancaram os fagos (Chain *et al.*, 1940). Chain iniciou o estudo de substâncias antibacterianas produzidas por micro-organismos, que culminaram com a descoberta das propriedades terapêuticas da penicilina pura. Com isso, em 1945, Chain, Florey e Fleming compartilharam o Prêmio Nobel pela "descoberta da penicilina e seu efeito curativo em várias doenças infecciosas" (Chain *et al.*, 2005). A **Figura 5** apresenta alguns fatos importantes da linha histórica da descoberta e utilização dos fagos na ciência.

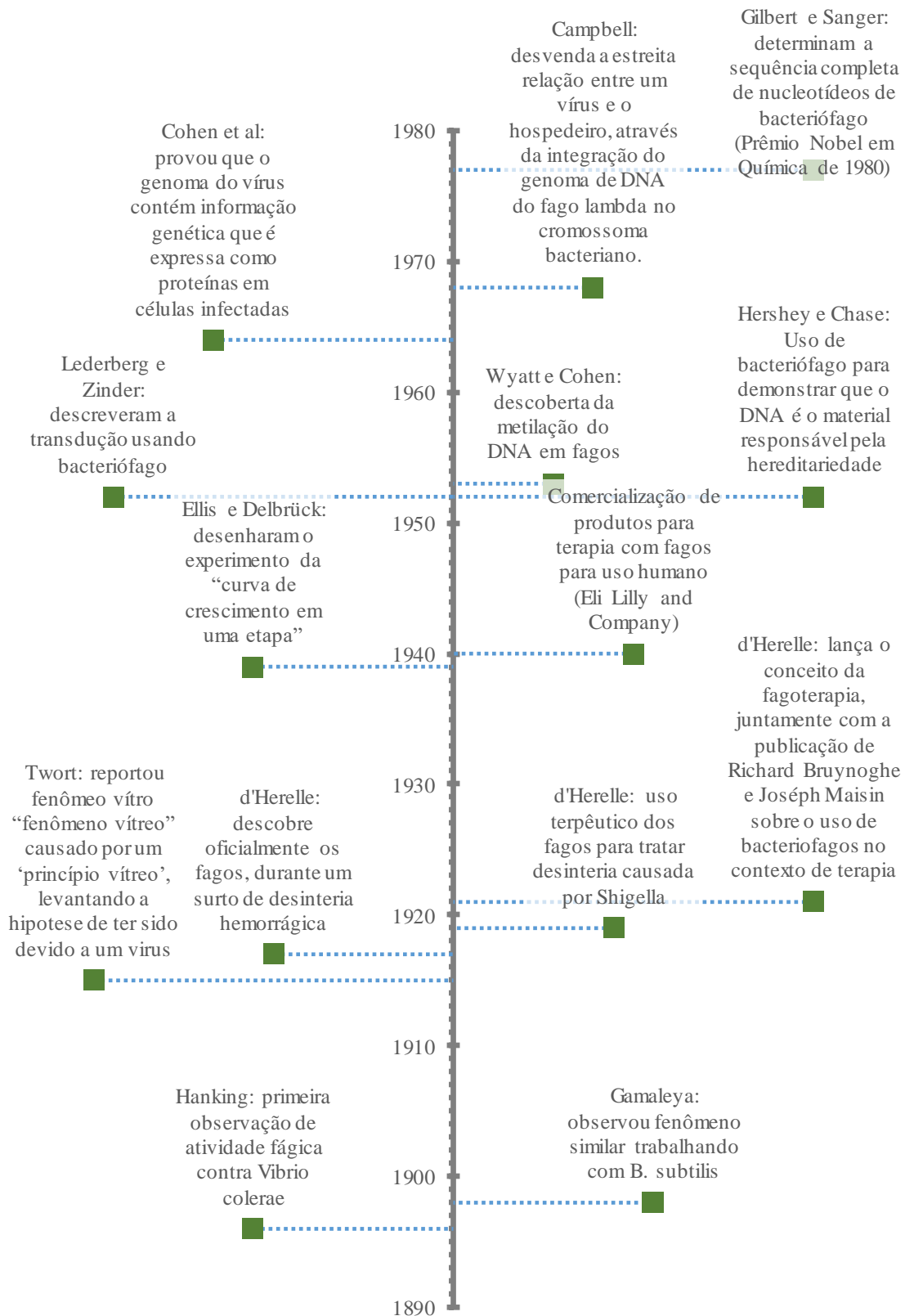


Figura 5. Linha histórica da descoberta e utilização dos bacteriófagos na ciência. Fonte: autoral. Literatura consultada: Knipe, Howley (2007).

2.6 Bacteriófagos: definição, classificação e características

Também chamados simplesmente fagos, são vírus de bactérias e, como os demais vírus, não possuem maquinaria metabólica própria, sendo incapazes de se replicar de forma independente (Zaha *et al.*, 2014). Como parasitas bacterianos que ocorrem naturalmente, são, em última análise, dependentes de um hospedeiro bacteriano para sobrevivência (Lin *et al.*, 2017). A célula hospedeira é o principal recurso para fagos e a qualidade do recurso, isto é, o estado metabólico da célula hospedeira, é um fator crítico em todas as etapas do ciclo de vida do fago (Weinbauer, 2004).

Os bacteriófagos são formados por dois componentes básicos: proteína (capsídeo) e ácido nucleico (genoma) (Brown, 2008). O tamanho de um fago varia de 20 a 200 nm de comprimento, com uma grande variedade de formas e simetria de capsídeos (Sinha *et al.*, 2018). Em 2007, Ackermann publicou uma breve revisão na qual afirma que pelo menos 5.568 fagos foram examinados no microscópio eletrônico desde a introdução da coloração negativa em 1959 (Ackermann, 2007). Devido à grande diversidade na organização dos seus capsídeos, genomas (constituídos de RNA ou DNA, de fita simples ou de fita dupla) e diferenças em relação aos hospedeiros, os fagos são classificados em diferentes famílias (Zaha *et al.*, 2014) (Tabela 5).

Tabela 5. Classificação e propriedades básicas de bacteriófagos.

| Família | Ácido nucleico | Particularidade(s) |
|----------------|---------------------------------|---|
| Ampullaviridae | dsDNA, | Morfologias pleomórficas |
| Bicaudaviridae | dsDNA | Duas caudas de estrutura tubular |
| Corticoviridae | dsDNA, circular, superenrolado | Capsídeo proteico icosaédrico com membrana interna proteica envolvendo o genoma |
| Cystoviridae | dsRNA, linear, segmentado | Esférico, envelopado |
| Fuselloviridae | dsDNA, circular superhelicoidal | Capsídeo cônico, forma de limão |
| Glubuloviridae | dsDNA | Esférico. |
| Guttaviridae | dsDNA, circular | Ligeiramente pleomórficos, com envelope |

| | | |
|------------------|---------------------------|---|
| Inoviridae | ssDNA, circular | Filamentos, sem envelope |
| Leviviridae | ssRNA, linear | Capsídeo icosaédrico, sem envelope |
| Lipothrixviridae | dsDNA, linear | Capsídeo em forma de bastão, com envelope lipoproteico |
| Microviridae | ssDNA, circular | Capsídeo com 12 capsômeros |
| Myoviridae | dsDNA, linear | Cauda longa contrátil |
| Plasmaviridae | dsDNA, circular | Sólido núcleoproteico cercado por membrana, sem capsídeo nítido |
| Podoviridae | dsDNA, linear | Cauda curta e rígida |
| Rudiviridae | dsDNA, linear | Vírus do mosaico do tabaco |
| Salterprovirus | dsDNA, linear, segmentado | Forma de limão |
| Siphoviridae | dsDNA, linear | Cauda longa não contrátil |
| Tectiviridae | dsDNA, linear | Vesícula lipoproteica interna ao rígido capsídeo |

Legenda: dsDNA: ácido desoxirribonucleico dupla fita; ssDNA: ácido desoxirribonucleico de fita simples; ssRNA: ácido ribonucleico de fita simples. Fontes utilizadas: Abedon (2006); Negroni (2018).

São encontrados em 11 filos Eubacterianos e Arquea e infectam 154 gêneros hospedeiros, principalmente dos filos Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria (Ackermann, 2007). A maioria dos virions (96%) tem cauda, e, destes, 61% têm caudas longas e não contráteis e pertencem à família Siphoviridae. Apenas 208 fagos (3,7%) são poliédricos, filamentosos ou pleomórficos (Ackermann, 2007; Ackermann & Wegrzyn, 2014). Cerca de 90% dos fagos possuem genoma de fita dupla (Resende, 2015).

Os bacteriófagos de cauda têm origem comum e constituem uma Ordem, denominada Caudovirales, com três famílias que se diferem conforme a morfologia da cauda: *Siphoviridae* (cauda longa, não contrátil), *Myoviridae* (cauda contrátil) e *Podoviridae* (cauda bem curta) (Ackermann, 1998) (**Figura 6**). Há uma estimativa de existir acima de 10^{30} fagos com cauda na biosfera e de que estes fagos provavelmente constituem a maioria absoluta dos "organismos" em nosso planeta em números absolutos (Brüssow & Hendrix, 2002). São fagos que apresentam capsídeo composto por revestimento proteico, não possuem envelope e eles são distinguidos por simetria

binária, isto é, simetria de cubo para cabeça de fago e em forma helicoidal para a cauda (Negroni, 2018). Representam o mais diversificado de todos os grupos virais, sendo extremamente variados no conteúdo e composição do DNA, dimensões e estrutura fina, características fisiológicas e gama de hospedeiros (Abedon, 2006). Ainda, as fibras da cauda viral são responsáveis pela ligação com os receptores bacterianos, definindo deste modo a gama de hospedeiros desse bacteriófago (Chaturongakul & Ounjai, 2014).

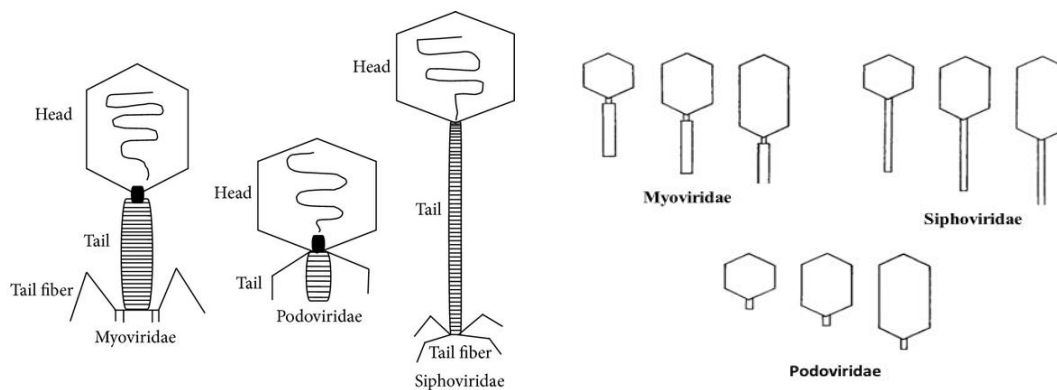


Figura 6. Exemplos de estruturas de fagos com cauda. Fontes: Elbreki *et al.*, (2020); Ackermann, 1998.

Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV, sigla de *International Committee on Taxonomy of Viruses*), os fagos são classificados com base nas propriedades morfológicas, físico-químicas e físicas, proteicas, lipídicas e biológicas, conforme **Tabela 6**.

Tabela 6. Propriedades dos fagos utilizadas na taxonomia (ICTV).

| Propriedade | Descrição |
|--------------|---|
| Lipídeos | Conteúdo, características, etc. |
| Morfologia | Tamanho, forma, envelope (presença, ausência), simetria do capsídeo, estrutura. |
| Propriedades | Hospedeiro, modo de transmissão no ambiente, relação com vetores, |

| | |
|--|--|
| biológicas | distribuição geográfica, patogenicidade, tropismo tecidual, etc. |
| Propriedades físico-químicas e físicas | Massa molecular, coeficiente de sedimentação, estabilidade (pH, temperatura, cátions, solventes, detergentes, etc.). |
| | Tamanho do genoma, ácido nucleico (DNA ou RNA, cadeia simples ou de cadeia dupla), genoma (linear, circular), número, tamanho de segmentos, etc. |
| Proteínas | Número, tamanho, atividade funcional das proteínas estruturais e não-estruturais e atividade funcional especial. |

Fonte: ICTV, 2020.

A capacidade dos bacteriófagos de sobreviver em condições desfavoráveis é altamente diversificada e influenciada por diferentes fatores físicos e químicos externos, como temperatura, acidez e íons, na persistência do fago (Jończyk *et al.*, 2011). Dentre os fatores cruciais para sobrevivência do bacteriófago está a temperatura (Olson *et al.* 2004), pois desempenha papel importante na fixação, penetração, multiplicação e na duração do período latente (no caso de fagos lisogênicos) (Tey *et al.* 2009). A temperatura determina ainda a ocorrência, viabilidade e armazenamento de bacteriófagos (Jończyk *et al.*, 2011).

Outro fator importante à estabilidade do fago é a acidez do ambiente. Alguns fagos, como o fago λ , podem ser altamente estáveis em uma ampla faixa de pH (Jepson & March, 2004). Neste caso específico, 24 horas de incubação à 19 °C, os autores não observaram nenhuma diminuição significativa em seu título na faixa de pH 3 a 11, mas em pH 2 e pH de 11,8 a 14 ou, nenhuma partícula de fago viável foi observada.

O fato de ser de uma mesma família e até mesmo possuir similaridade estrutural próxima pode não determinar as características de um fago e a resistência a fatores externos (Ackermann *et al.*, 2004). A resistência dos bacteriófagos a estes fatores é importante para a estabilidade das preparações de fagos que serão usadas em biocontrole. Alguns fagos (maioria dos fagos com cauda e icosaédricos ("cúbicos") e

fagos filamentosos sem lipídios) são facilmente armazenados mais de 5 a 10 anos e seus títulos devem diminuir em 1 log por ano. Fagos contendo lipídios tendem a ser mais fastidioso e instável, e deveriam ser controlados anualmente (Jończyk et al, 2011). Fagos com cauda são relativamente estáveis ao armazenamento à -80 °C e em nitrogênio líquido. São estáveis também quando armazenados a -4 °C, independentemente de seu hospedeiro, posição taxonômica ou morfologia (Ackermann *et al.* 2004).

A liofilização de fagos parece controversa. Quando liofilizados com 50% de glicerol, a maioria dos títulos de fago diminuíram em aproximadamente 1 log após 30 dias da liofilização. Ampolas que perderam a capacidade de manter o vácuo, inviabilizaram os fagos após um ano. Ampolas que mantiveram o vácuo, foram armazenadas em câmara fria e, mais de 20 anos depois, descobriu-se que todas as ampolas com vácuo intacto continham fagos viáveis (Ackermann *et al.* 2004).

De acordo com o seu ciclo vital, os bacteriófagos se classificam em dois grupos: lítico (ou virulento) e lisogênico (ou temperado). Na infecção de uma bactéria por um fago ocorrem as etapas de colisão, adsorção e injeção do ácido nucleico. Após a entrada do genoma viral em um hospedeiro suscetível, o fago pode entrar em um ciclo lítico ou lisogênico, dependendo da natureza do fago (se virulenta ou temperada) (Zaha *et al.*, 2014). A diferença entre os dois grupos é que um fago lítico destrói sua bactéria hospedeira depois da infecção inicial, enquanto que um fago lisogênico pode permanecer latente dentro de sua hospedeira por um período substancial (Brown, 2008). (Figura 7).

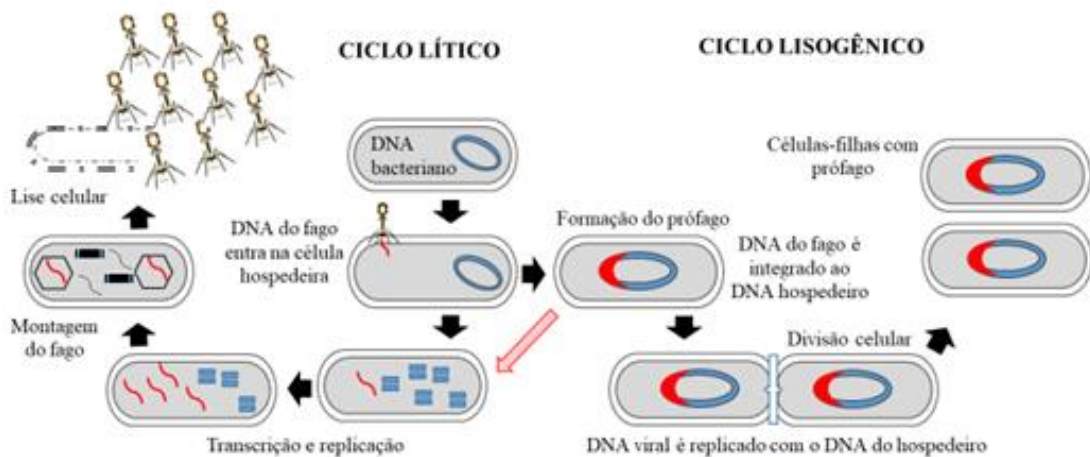


Figura 7. Ciclo de vida lítico e lisogênico de bacteriófagos.

Deste modo, o ciclo de vida de um vírus pode ser dividido em seis etapas (Sulakvelidze, 2011; Madigan et al, 2016; Ryu, 2017)

1) **Interação fago-hospedeiro ou adsorção** (ligação do vírion à célula hospedeira): a primeira etapa no ciclo de reprodução do fago é a ligação do fago à célula bacteriana: uma ligação reversível, mediada por uma estrutura de superfície celular definida. Quando ocorre uma ligação entre uma estrutura de fago (por exemplo, as fibras da cauda) a um receptor na superfície celular do hospedeiro, ocorre uma ligação irreversível, a adsorção do fago, conduzindo para a segunda etapa.

2) **Penetração** (entrada ou injeção do ácido nucléico do vírion na célula hospedeira);

3 e 4) A terceira e quarta etapas dizem respeito à **síntese de componentes** de replicação do material genético e à produção de novos capsídeos utilizando a maquinaria biossintética da bactéria hospedeira, de acordo com o redirecionamento determinado pelo vírus. O transporte mediado por microtúbulos é usado para entregar a partícula do vírus a locais apropriados na célula.

5) **Montagem** dos capsídeos e empacotamento do genoma.

6) **Liberação de novos vírions pela célula:** os vírus nus saem das células por lise celular, enquanto os vírus envelopados saem das células por meio de brotamento através das membranas celulares.

Os estágios de replicação viral formam uma curva de crescimento. O ciclo reprodutivo lítico culmina na morte da célula hospedeira e o termo refere-se ao último estágio da infecção, durante o qual ocorre a lise da bactéria e liberação dos fagos produzidos dentro da célula (Reece *et al.*, 2015). O ciclo de vida de um fago lítico típico, o tempo decorrido entre a infecção e a liberação da progênie é chamado *período de latência*, e o número de fagos liberados é denominado *tamanho da progênie* (Watson *et al.*, 2015).

Há vários tipos de receptores presentes na superfície de células bacterianas, onde os fagos são adsorvidos. A natureza química destes receptores pode variar de uma espécie bacteriana para outra, assim como de um tipo de fagos para outro. A especificidade de um bacteriófago e seu hospedeiro se dá principalmente pela singularidade da interação do fago com o receptor do hospedeiro (Gadd & Sariaslani, 2018). Após a adsorção, vírions infecciosos não podem ser detectados no meio de cultura, um fenômeno denominado *eclipse*, o qual faz parte do *período de latência*. No eclipse, uma vez ligados à célula hospedeira, ficam indisponíveis para infectar outras células. É no período latente que o ácido nucléico viral é replicado e ocorre a síntese proteica. Neste período de maturação, o ácido nucleico e as proteínas são agrupados para formar vírions ativos, cujo título aumenta no interior da célula. Ao final da maturação, os vírions maduros são liberados da célula hospedeira (*burst size*) (Madigan *et al.*, 2016).

A determinação dos parâmetros de crescimento do bacteriófago é essencial para o planejamento adequado da produção do bacteriófago e a estimativa da eficácia da

terapia com bacteriófago (Šivec & Podgornik, 2020). É possível conhecer o tempo necessário para um fago sofrer um ciclo lítico de multiplicação e o número de progênie do fago produzido por cada célula bacteriana através do experimento denominado *Curva de crescimento de uma única etapa* (**Figura 8**).

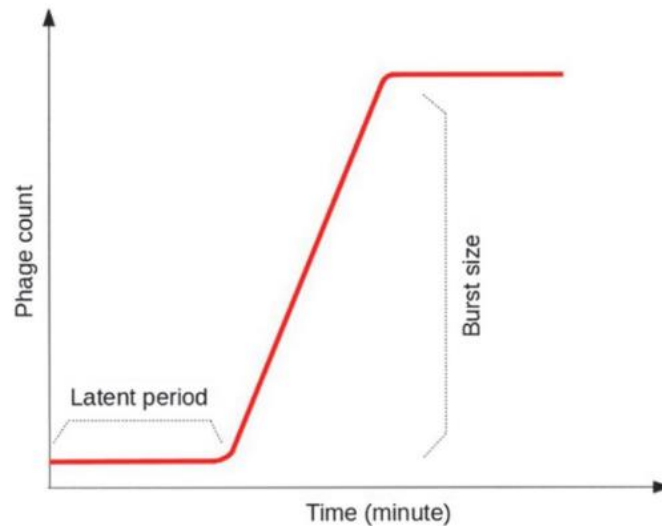


Figura 8. Curva de crescimento de uma única etapa.
Fonte: Sinha *et al.* (2018).

Este experimento foi desenhado por Ellis e Delbrück em 1939. Nele, um fago anti-*Escherichia coli* foi isolado e seu comportamento estudado, descrevendo-se as etapas de crescimento do fago divididas em três períodos: adsorção do fago na bactéria, crescimento sobre ou dentro da bactéria (período latente) e a liberação do fago (explosão ou *burst*) (Ellis & Delbrück, 1939). Assim, os autores apresentaram evidências detalhadas de que a liberação de fagos ocorreu em explosões repentinas, compatíveis com a suposição de que esse fato ocorria apenas se, e quando uma célula fosse lisada. Em pesquisa posterior, Delbrück estudou com mais detalhes a relação entre o crescimento do fago e lise bacteriana (Delbrück, 1940).

É possível avaliar a capacidade lítica de bacteriófagos através da mistura de fagos com as células bacterianas a serem testadas com ágar semi-sólido. Esta mistura é vertida sobre uma base de ágar sólido em uma placa de Petri, onde o ágar forma uma camada gelatinosa, na qual as bactérias ficam suspensas. As placas são incubadas para permitir a multiplicação bacteriana e a infecção do fago. Cada célula infectada será lisada durante a incubação, e a progênie do fago se difunde no ágar semissólido, infectando as células bacterianas mais próximas, que também serão lisadas (Watson *et al.*, 2015). O resultado de muitos ciclos de infecção é a formação da placa de lise (Figura 9).

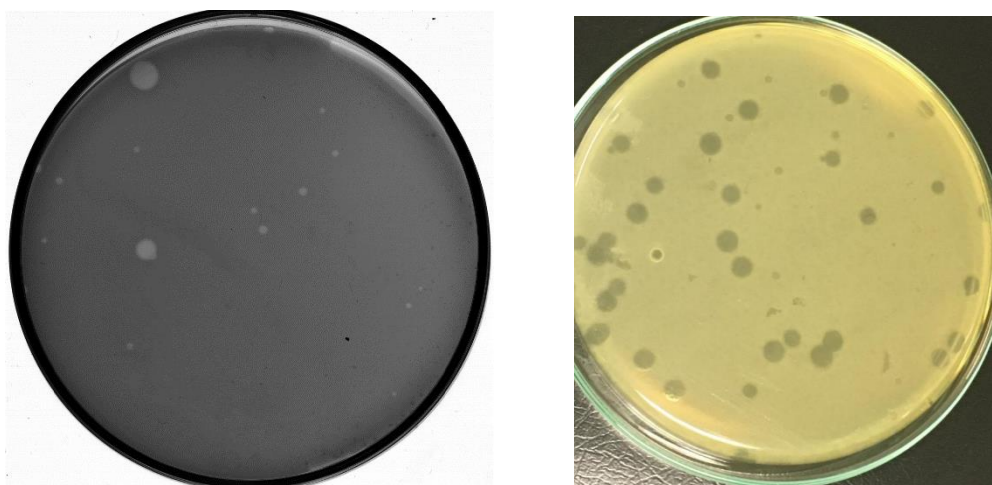


Figura 9. Placas de lise (clareira circular) formadas pela infecção de um fago em camada de células bacterianas em ágar semissólido. Fonte: autoral.

A aparência da placa depende da cepa do hospedeiro, do vírus e das condições ambientais. De modo geral, estirpes altamente virulentas ou líticas produzem placas claras, enquanto estirpes que matam apenas uma fração de seus hospedeiros ou apenas reduzem a taxa de crescimento celular, produzem placas turvas (Slonczewski & Foster, 2016).

No entanto, a infecção de uma bactéria por um vírus nem sempre resulta em reprodução viral e lise bacteriana. Alguns bacteriófagos virulentos podem entrar em um estado de portador, conhecido como *pseudolisogenia*, no qual o fago não lisa a célula hospedeira nem integra seu DNA ao cromossomo. Um exemplo de pseudolisogenia ocorre durante a infecção de células esporuladas: o DNA do fago é incorporado - "preso" - ao endosporo em desenvolvimento, aparentemente como DNA livre, onde fica armazenado. Após a germinação do esporo e crescimento das células vegetativas, o fago ativa sua resposta virulenta usual (Sonenshein, 2006; Weinbauer, 2004.).

Por fim, a resposta lisogênica de uma infecção consiste na criação de DNA fágico a partir do cromossoma do hospedeiro: o fago replica-se sem causar a lise das células. Assim, a cada replicação do cromossomo bacteriano, o DNA viral também é replicado, sendo transmitido às células-filhas da bactéria depois da divisão (Klug *et al.*, 2009). Em condições apropriadas, o DNA lisogênico deixa o cromossomo e entra no ciclo lítico (Purves *et al.*, 2005). No estado denominado lisogenia, o genoma viral é replicado em sincronia com o cromossomo do hospedeiro (prófago) e passado às células-filhas durante a divisão celular (Madigan *et al.*, 2016).

2.7 Uso de fagos na terapia fágica e como biocontrole

A diversidade de fagos é imensa. A abundância de vírus varia em diferentes ambientes e está relacionada à abundância ou atividade bacteriana (Weinbauer, 2004). Usando técnicas de cultivo, é relativamente fácil encontrar vários tipos de fagos que infectam isolados microbianos (Rohwer, 2003). O hospedeiro alvo de cada fago é um grupo específico de bactérias. Esse grupo geralmente é um subconjunto de uma espécie, mas várias espécies relacionadas, às vezes, podem ser infectadas pelo mesmo fago

(Guttman *et al.*, 2004). A gama de hospedeiros de bacteriófagos é por definição um repertório de espécies bacterianas e estirpes que são capazes de suportar a multiplicação de determinado vírus (Letarov & Kulikov, 2018).

Vários fatores influenciam a infectividade de um vírus, tais como proporção de partículas virais, suscetibilidade da célula hospedeira (receptor) e a chance de penetração na célula. Células suscetíveis podem receber uma ou mais partículas virais: número médio de fagos por bactéria é a multiplicidade de infecção (MOI – *Multiplicity of Infection*). Trata-se da representação da proporção do número de partículas virais para o número de células hospedeiras em um determinado meio de infecção. O valor de MOI 1, por exemplo, implica que há uma célula hospedeira para cada partícula viral (Gadd & Sariaslani, 2018).

Normalmente, apenas fagos líticos são usados durante a terapia fágica e são considerados bastante seguros, pois são altamente específicos – ativo contra apenas uma espécie bacteriana, cepa ou subgrupo de cepas – e não pode infectar células eucarióticas (Sulakvelidze, 2011). Os fagos monovalentes são específicos para um tipo de espécies bacterianas, mas fagos polivalentes são capazes de atacar diferentes (duas ou mais) espécies bacterianas (Zbikowska *et al.*, 2020).

A terapia fágica foi redescoberta após publicações de trabalhos de Smith e Huggins na década de 1980. Em estudos publicados em 1983 e em 1987, os autores mostraram ser possível o controle da diarreia experimental de *Escherichia coli* em bezerros, leitões e cordeiros por meio de bacteriófagos (Smith & Huggins, 1983; Smith *et al.*, 1987). Em 1982 os autores já haviam mostrado a eficácia do uso de fagoterapia como tratamento de infecções experimentais por *E. coli* em camundongos e sua superioridade geral sobre os antibióticos tetraciclina, ampicilina, cloranfenicol e trimetoprim-sulfametoxazol (Smith & Huggins, 1982).

Slopek *et al.* (1985) analisaram os resultados da terapia fágica aplicada em 114 casos de infecções sépticas, espontâneas ou pós-operatórias, causadas por bactérias estafilococos piogênicas, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus* e *Pseudomonas* em crianças nos anos de 1981–1986. Os resultados terapêuticos obtidos foram positivos em 109 (95,6%) casos, confirmando grande eficácia dos bacteriófagos no tratamento de infecções bacterianas.

Analisando os resultados de terapia por bacteriófago de infecções bacterianas supurativas entre os anos de 1981-1986, Slopek *et al.* (1987) mostraram que os resultados obtidos foram positivos em 508 casos (92,4%). Em 38 casos (6,9%) foi observada uma melhoria transitória e em 4 casos (0,7%) o tratamento com fagos revelou-se ineficaz. Considerando que a maioria dos pacientes (518 casos, 94,2%) eram resistentes ao tratamento com antibióticos, os resultados da terapia fágica foram considerados favoráveis.

Segundo Weber-Dabrowska *et al.* (2000), 1.307 pacientes com infecções bacterianas supurativas causadas por bactérias multirresistentes de diferentes espécies foram tratados com bacteriófagos específicos. A recuperação total foi observada em 1123 casos (85,9%). Em 134 casos (10,9%) uma melhora transitória foi observada e apenas em 50 casos (3,8%) o tratamento foi considerado ineficaz. Os resultados confirmam a alta eficácia da terapia com bacteriófagos no combate a infecções bacterianas que não respondem ao tratamento com os antibióticos disponíveis.

A terapia fágica tem uma longa história de sucesso. Abedon *et al.* (2011) mostrou em uma revisão bastante completa que os fagos podem ser usados como "drogas" antibacterianas naturais e autoamplificantes para tratar ou prevenir com segurança e eficácia muitas doenças humanas comuns de etiologia bacteriana. Os

autores afirmam que já existem evidências suficientes para recomendar fortemente a avaliação contínua desta abordagem antibacteriana alternativa.

Dentre as vantagens que os fagos têm sobre os antibióticos no que diz respeito à terapia estão: a especificidade dos bacteriófagos a um hospedeiro alvo, sem afetar o balanço microbiológico do paciente; sua natureza não infecciosa para os humanos torna-os seguros, não apresentando os efeitos colaterais causados por antibióticos; havendo células hospedeiras, os fagos aumentam exponencialmente em número ao longo do tempo; a resistência aos antibióticos não se limita às bactérias atingidas na antibioticoterapia; o processo de seleção de fagos para fagoterapia em casos de bactérias fago-resistentes é muito mais rápido que o desenvolvimento de um antibiótico contra bactérias antibiótico-resistentes; por fim, terapias fágicas são altamente eficientes e relativamente econômicas (Yao & Moellering, 1995; Chopra *et al.*, 1997; Dixon, 2004; Thiel, 2004; Parisien *et al.*, 2007).

Fagos líticos têm várias aplicações potenciais na indústria de alimentos como agentes de biocontrole, biopreservativos e como ferramentas para detectar patógenos (Kazi & Annapure, 2016). Os fagos podem ser substitutos seguros de agentes químicos tóxicos, como antibióticos ou outros agentes bactericidas no controle de doenças de plantas (Soleimani-Delfan *et al.*, 2015).

Testados em diferentes sistemas alimentares para a inativação dos principais patógenos alimentares e também para o controle de bactérias deteriorantes, mostraram-se promissores na biopreservação de alimentos: apresentam especificidade de hospedeiro, são considerados seguros devido à baixa toxicidade e não apresentam outros efeitos prejudiciais para a saúde humana (Pulido *et al.*, 2016). A pesquisa atual sobre o uso de fagos e suas proteínas líticas, especificamente contra infecções

bacterianas multirresistentes, sugere que a terapia fágica tem o potencial de ser usada como alternativa ou suplemento aos tratamentos com antibióticos (Lin *et al.*, 2017).

Zbikowska *et al.* (2020) mostraram eficácia da aplicação de bacteriófagos na avicultura e os considerou uma alternativa útil aos antibióticos na era da resistência às multidrogas e na tendência crescente de caminhar para a era pós-antibiótica. Várias empresas estão comercializando bacteriófagos ou produtos à base de bacteriófagos para utilização na indústria de alimentos (**Tabela 7**).

Tabela 7. Produtos à base de bacteriófagos utilizados na indústria de alimentos.

| Produto | Bactéria alvo | Empresa | País |
|-------------------|------------------------------------|--|---------------------------|
| Bafasal® | <i>Salmonella</i> | Proteon Pharmaceuticals | Polônia |
| Biotector® S | <i>Salmonella</i> | Instituto de Pesquisas em Biotecnologia Cheil Jedang | Coreia do Sul |
| BacWash™ | <i>Salmonella</i> | OmniLytics Inc | Estados Unidos da América |
| EcoShield™ (a) | <i>Escherichia coli</i> O157:H7 | Intralytix Inc. | Estados Unidos da América |
| Ecolicide® | <i>Escherichia coli</i> O157:H7 | Intralytix Inc. | Estados Unidos da América |
| Ecolicide PX™ | <i>Escherichia coli</i> O157:H7 | Intralytix Inc. | Estados Unidos da América |
| ListShield™ (a) | <i>Listeria monocytogenes</i> | Intralytix Inc. | Estados Unidos da América |
| ListPhage™ | <i>Listeria monocytogenes</i> | Intralytix Inc. | Estados Unidos da América |
| Listex™ (a) | <i>Listeria monocytogenes</i> | Microos Food Safety BV | Países Baixos |
| SalmoLyse® | <i>Salmonella</i> | Intralytix Inc. | Estados Unidos da América |
| SalmoPro® (a) | <i>Salmonella</i> | Phagelux | Canadá |
| SalmoFresh™ (a) | <i>Salmonella</i> | Intralytix Inc. | Estados Unidos da América |
| SalmoFREE® | <i>Salmonella</i> | Sciphage | Colômbia |
| Salmonalex™ (a) | <i>Salmonella</i> | Microos Food Safety BV | Países Baixos |
| ShigaShield™ | <i>Shigella</i> | Intralytix Inc. | Estados Unidos da América |
| PhageGuard E™ (a) | <i>Escherichia coli</i> O157 | Microos Food Safety BV | Países Baixos |

Legenda: (a) aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA).

O primeiro produto fágico relacionado à segurança alimentar, aceito pela *Food and Drug Administration* (FDA) em agosto de 2006, foi o ListShield™, fabricado pela empresa Intralytix Inc. (Columbia, EUA), um coquetel de fagos utilizado no controle de *Listeria monocytogenes* em produtos de carne e aves (Sulakvelidze, 2011). Além do ListShield™, a empresa norte-americana produz outros produtos baseados em bacteriófagos para controle de bactérias patogênicas em alimentos, tais como *Salmonella* (SalmoFresh™), *Shigella* spp. (ShigaShield™) e *Escherichia coli* (EcoShield PX™) (Intralytix, 2020). No entanto, essa tecnologia ainda está em desenvolvimento e há desafios a serem superados antes que os bacteriófagos possam ser amplamente usados para controlar bactérias patogênicas.

O produto Bafasal® é um aditivo de ração aprovado por regulamentação para uso em aves para eliminar ou prevenir infecção no trato digestivo em aves. Este produto pode ser adicionado à água potável e apresenta efeito profilático e intervencionista pós-infecção. Trata-se de uma preparação de bacteriófago com alta especificidade para sorovares de *Salmonella*, incluindo Enteritidis, Typhi, Paratyphi, Typhimurium, Branderburg, Hadar (Proteon Pharmaceuticals, 2020; Wójcik *et al.*, 2015).

O Biotector® S pode ser aplicado na alimentação animal para controlar *Salmonella* em aves (Cheil Jedang, 2020), assim como o SalmoFREE®, desenvolvido para terapia e controle de *Salmonella* em granjas avícolas (Holguín-Moreno *et al.*, 2017). O produto BacWash™ foi desenvolvido para desinfetar superfícies, sendo utilizado em animais antes do abate, aplicado como uma lavagem ou pulverizado diretamente no animal vivo. Sua liberação foi autorizada pelo *United States Department of Agriculture* (USDA) () para controlar *Salmonella* (OmniLytics Inc., 2020). O

SalmoPro®, SalmoFresh™ e Salmonelex™, (PhageGuard) e PhageGuard S™ são produtos aprovados para uso como um auxiliar de processamento antimicrobiano para controlar *Salmonella* em alimentos (Phagelux, 2020; Microcos Food Safety BV, 2020).

A atividade antimicrobiana dos fagos tem sido analisada na área de agronomia para o biocontrole de fitobactérias, sem, entretanto, existir no mercado, até o momento, um produto que possa ser usado no campo para este fim. Existem diversos fagos de *P. syringae* isolados, caracterizados e com genoma cadastrado no GenBank. São exemplos os fagos MR (13 fagos) (Rabiey *et al.*, 2020), ϕ Psa (24 fagos) (Frampton *et al.*, 2014), Pto (18 fagos) (Prior *et al.*, 2007), vB_PsyM_KIL (5 fagos) (Rombouts *et al.*, 2016), ϕ PSA1 e ϕ PSA2 (Di Lallo *et al.*, 2014), Φ XWY (3 fagos) (Yin *et al.*, 2018), vB_PsyS_Phobos (Amarillas *et al.*, 2020), entre outros (Pinheiro *et al.*, 2019; Pinheiro *et al.*, 2020).

O controle biológico não necessita de altos custos para sua aplicabilidade e é um método que pode ser utilizado em qualquer bactéria. No que diz respeito a estudos que de fagos para biocontrole de bactérias do gênero *Pseudomonas* fitopatogênicas, pode-se citar Kim *et al.* (2011), Yu *et al.* (2015) e Rombouts *et al.* (2016). O primeiro estudo diz respeito ao uso de bacteriófagos de *Pseudomonas tolaasii* para o controle biológico da mancha marrom em cogumelos. O segundo, isolou e caracterizou bacteriófagos contra *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, que causa cancro bacteriano em kiwi. O terceiro, por sua vez, caracterizou novos bacteriófagos para o biocontrole da mancha bacteriana do alho-poró causada por *Pseudomonas syringae* pv. *porri*.

Ao longo do tempo, diversos estudos usando bacteriófagos foram desenvolvidos na área da agricultura. Thomas (1935) realizou testes em campo, mostrando que o tratamento de sementes com fago contra o fitopatógeno *Pantoea stewartii* reduzia a incidência da doença de murcha de Stewart do milho. Muitas pesquisas foram feitas

com cultivos de importância econômica, como tomate (Fujiwara *et al.*, 2011; Bae *et al.*, 2012; Obradovic *et al.*, 2004) e batata (McKenna *et al.*, 2001; Czajkowski *et al.*, 2014; Czajkowski *et al.*, 2015; Adriaenssens *et al.*, 2012). Embora emergente, o uso de biocontrole de fago na prática agrícola ainda é incomum.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Isolar, caracterizar e avaliar o efeito de bacteriófago para bactéria *Pseudomonas cichorii*.

3.2 Objetivos específicos

- a) Isolar bacteriófago para *Pseudomonas cichorii*;
- b) Testar a especificidade e estabilidade do bacteriófago;
- c) Avaliar ciclo de vida (lítico ou lisogênico) do bacteriófago;
- d) Caracterizar o bacteriófago quanto ao tipo e tamanho do material genético;
- e) Avaliar atividade antimicrobiana do bacteriófago frente à *Pseudomonas cichorii* por meio de estudos *in vitro*;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Hospedeiro e condições de cultura

A cepa de referência *Pseudomonas cichorii* (Swingle 1925, Stapp 1928), nº 1526 (isolada de *Lactuca sativa*, 2000, Brasil) foi adquirida da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF), Brasil. *P. cichorii* foi criopreservada a -80 °C em Caldo Triptona de Soja (TSB, Kasvi®, Brasil) com 30% (m/v) de glicerol (Dinâmica®, Brasil). A cepa bacteriana foi cultivada a 28 °C e rotineiramente reativada em TSB, sem agitação devido à sensibilidade extremamente alta dessas bactérias ao estresse mecânico (D'hondt, 2011).

Para replicar e contar partículas de fago, foram usados meio TSB contendo 2,0% (m/v) de ágar (Vetec®, Brasil) (TSB-A) e sobreposições de meio TSB semi-sólido contendo 0,4% (m/v) de ágar (TSB-SA). Todos os meios utilizados (TSB, TSB-A e TSB-AS) foram suplementados com peptona bacteriológica 1% (Kasvi®, Brasil). Todas as soluções foram preparadas com água destilada e autoclavadas a 121 °C por 15 min, conforme orientação do fabricante.

4.2 Isolamento de fago, purificação e propagação

O isolamento, a purificação e a propagação de fagos foram realizados de acordo com os métodos descritos em Sambrook e Russell (2001) e Azeredo *et al.* (2014), com modificações. Para o isolamento, 10 g de uma amostra sólida múltipla contendo alface, chicória e repolho, cujas folhas tivessem marcas visíveis de bacteriose (manchas necróticas marrom-escuras) foram colocados em 50 ml de solução NaCl (Sigma Aldrich) 0,9% (m/v), juntamente com 50 µl de bactérias cultivadas *overnight*

(concentrada para que atingisse densidade óptica [DO] 0,5 medida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm) (SpectraMax M2e, Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA) e 50 ml de TSB duplo em um Erlenmeyer de 250 ml. Incubou-se a 28 °C, sem agitação por 18 h e depois sob agitação (80 rpm) por 6 h. A amostra foi centrifugada (9.000 rpm, 4 °C por 10 min) e o sobrenadante foi coletado e filtrado com filtro de seringa de 0,2 µm para tubos estéreis.

O método de dupla camada de ágar foi usado para examinar se o filtrado continha bacteriófagos líticos para o *P. cichorii*. Resumidamente, 100 µl de suspensão bacteriana crescida *overnight* e 4 ml de TSB-SA fundido e mantido a 42 °C em banho-maria, foram colocados em um tubo de ensaio, agitados suavemente e derramados em uma placa contendo TSB-A. Após a secagem completa, gotas de 10 µl da amostra filtrada foram adicionadas às placas TSB-A sob a camada bacteriana e as placas inclinadas a 45° (técnica de microgotas). As placas foram incubadas durante a noite a 28 °C. Zonas de lise claras e turvas indicaram a presença de bacteriófagos líticos.

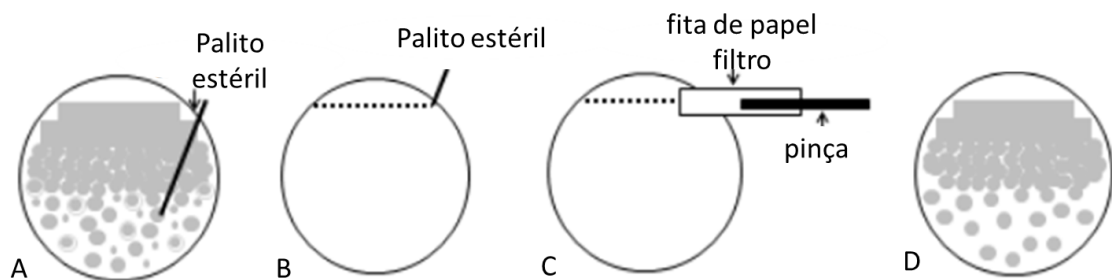


Figura 10. Isolamento de bacteriófagos. A) Punção em uma única placa de lise com auxílio de palito esterilizado. B) Linha pontilhada contendo fagos. C) Fita de papel filtro esterilizada sendo passada sobre a linha pontilhada com auxílio de uma pinça. D) Placas de lise e formadas após o processo. Fonte: Pires *et al.*, 2017.

A morfologia das placas de lise formadas pelos bacteriófagos foram observadas de modo a verificar diferença em tamanho, forma, halo e turbidez. Utilizou-se como critérios de seleção limpidez e tamanho da placa de lise, características associadas a um bacteriófago lítico. Para o isolamento de um tipo de bacteriófago somente, placas individuais bem isoladas foram puncionadas com um palito de dente esterilizado e tiras de papel filtro esterilizadas foram usadas para “empurrar” os bacteriófagos a partir da punção sobre a camada bacteriana de *P. cichorii* (**Figura 10**). A tira de papel era trocada após cada passagem, certificando-se de que a tira de papel tocasse no rastro da tira anterior. As placas de Petri foram então incubadas a 28 °C por 24 h. Uma série de etapas de purificação, isolamento de placa e co-cultivo foram realizadas pelo menos cinco vezes até que todas as placas de bacteriófago estivessem uniformes. As placas foram armazenadas a 4 °C até serem necessárias.

Para a produção de bacteriófagos, foram utilizadas as placas fágicas isoladas na etapa anterior, repetindo o processo com o palito, em pelo menos 10 placas contendo camada bacteriana de *P. cichorii*. Após incubação adequada (28 °C por 24 h), 4 ml de meio de magnésio salino (meio SM) (5,8 g/L de NaCl, 2 g/L de MgSO₄ 7H₂O [Vetec®, Brasil], 50 ml/L de 1 M Tris-HCl [Sigma Aldrich], pH 7,5) foram adicionados às placas e estas foram colocadas sob agitação (80 rpm) a 4 °C durante 18 h. Em seguida, o meio SM com os fagos eluídos foi coletado, centrifugado (9.000 rpm, 4 °C, 10 min) e filtrado (0,2 µm). Esta solução estoque de fago foi armazenada a 4 °C.

4.3 Determinação da gama de hospedeiros

Para determinar a gama de hospedeiros possível para os fagos isolados, foram preparadas placas com dupla camada de ágar com as seguintes bactérias: *P. cichorii*

(controle), *Klebsiella oxytoca* (ATCC 8724TM), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853 lote BFB 542), *Serratia* sp. (isolados clínicos) e *Pseudomonas fluorescens* (isolado de produto animal – carne). Estas bactérias foram utilizadas por serem bactérias descritas na literatura como fitobactérias que causam doenças bacterianas em hortaliças no Brasil, incluindo alface (Beriam, 2007).

As placas foram preparadas adicionando 1 ml de cultura bacteriana na fase exponencial de cada bactéria a ser testada a 4 ml de TSB-SA fundido e mantido a 42 °C. Agitou-se suavemente e derramou-se em uma placa contendo TSB-A. Depois de secar por 5 min, 10 µl de uma solução estoque de fago foram colocados sob a placa e incubou-se durante a noite na temperatura ideal para cada cepa bacteriana. Após a incubação, foi examinada a aparência das zonas de lise no local onde a suspensão de fago foi adicionada. O fago foi testado contra cada cepa bacteriana em triplicata, em experimentos independentes (réplicas biológicas).

4.4 Resistência térmica e sensibilidade ao pH

Os testes de resistência térmica e sensibilidade ao pH foram realizados de acordo com os métodos descritos em Capra et al. (2004) e Huaq *et al.* (2012). O fago purificado (contagem inicial 10⁸ PFU/ml) foi colocado em tubos Eppendorf e colocado em banho-maria sob várias temperaturas (4, 30, 45, 60, 75, 90 e 100 °C) durante 1 h. Para avaliar a sensibilidade do fago em diferentes níveis de pH, o fago purificado (contagem inicial 10⁸ PFU/ml) foi incubado a 28 °C por 1 h em meio SM com pH ajustado para 3, 5, 7,5 (controle), 8,5 e 11.

Após a incubação, a taxa de sobrevivência (em percentual) de cada tratamento foi determinada pelo ensaio de ágar de camada dupla, através da contagem de PFU/ml.

Cada ensaio foi realizado em duplicata, em dois experimentos independentes (réplicas biológicas).

4.5 Curva de crescimento de etapa única

O experimento de crescimento em uma única etapa foi realizado de acordo com os métodos descritos por Chen *et al.* (2018) e Haq *et al.* (2012), com modificações. Cultivo de *P. cichorii* ($DO_{600\text{ nm}} 0,200$) foi diluído para atingir $\sim 10^6$ CFU/ml. Em seguida, 100 μl de suspensão bacteriana foram misturados com 100 μl de lisado de fago (diluído para $\sim 10^3$ Unidades Formadoras de Placa [PFU]/ml) para um volume final de 1 ml com meio TSB estéril (MOI 0,001) e incubados a 28 °C por 10 min para permitir a adsorção dos fagos às células hospedeiras. Depois disso, a mistura foi centrifugada (10.000 rpm, 3 min, 4 ° C) para remover o fago livre não absorvido. O sedimento (*pellet*) foi lavado, centrifugado novamente e ressuscitado em 1 ml de TSB. Em seguida, 50 μl foram inoculados em 50 ml de TSB e a cultura incubada a 28 °C. Esse momento foi definido como $t = 0$, e a cada 10 min, uma amostra de 0,1 ml foi coletada, totalizando período de 160 min. O título do fago foi determinado pela técnica de dupla camada de ágar. A contagem de fagos livres no sobrenadante foi determinada em duplicata, em três experimentos separados.

O período de eclipse, período latente, *burst size* (tamanho da explosão) foi determinado de acordo com Middleboe *et al.* (2010). O período latente é o intervalo de tempo entre a adsorção e o início do primeiro *burst* (indicado pelo aumento inicial no título do bacteriófago), enquanto que o *burst size* é a razão entre a contagem final de partículas de bacteriófago liberadas e a contagem inicial de células bacterianas infectadas durante o período latente (Bao *et al.*, 2011).

4.6 Estocagem a baixa temperatura

O teste de sensibilidade ao congelamento foi realizado usando fago purificado com um título alto ($>10^{12}$ PFU/ml). A solução de fago em meio SM foi misturada com glicerol resultando em uma concentração final de 10%, 20% e 30% (v/v). As amostras foram dispensadas (0,2 ml por Eppendorf) e congeladas em regime de resfriamento lento (1 °C/min) (Clark; Geary, 1973). Após resfriamento atingir -10 °C, e permanecer nesta temperatura durante pelo menos 12 h, as amostras foram imediatamente armazenadas a -20 °C. Foram testadas alíquotas após 1, 8, 14 e 36 semanas quanto à viabilidade do fago, determinada pelo ensaio de ágar de camada dupla. Para isso, o fago foi descongelado *overnight* em refrigeração (4 °C) e testado no dia seguinte, colocando uma gota de 10 µl de fago sob placa contendo TSB-SA e *P. cichorii* e incubando-se durante 24 h a 28 °C. De modo a verificar se o fago estaria infectante se fosse repicado, repetiu-se o processo com o palito (punção na área de lise formada), em pelo menos placas contendo TSB-SA e *P. cichorii*. Após incubação adequada (28 °C por 24 h), as novas placas foram analisadas.

4.7 Extração de DNA

Para extrair o DNA genômico do fago, foi realizada inicialmente precipitação por polietilenoglicol (PEG) 8000 como método de concentração. Assim, 10 ml de lisado de fago de título elevado ($<10^{10}$ PFU/ml) foram misturados com PEG 8000 (10%) e NaCl (concentração final 1 M) e misturado suavemente por inversão. Foi deixado *overnight* a 4 °C e depois centrifugado a 10.000 rpm durante 30 min. O sobrenadante

contendo PEG foi descartado e o sedimento foi suspenso em MgSO_4 (5 mM), pipetando suavemente.

Em seguida, 500 μl da amostra concentrada foram transferidos para tubos Eppendorf de 2 ml marcados e o DNA do hospedeiro foi removido por tratamento com DNase I e RNase (1,25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ cada) (incubação a 37 °C por 1 h). Posteriormente, foram adicionados 1,25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de proteinase K (20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), 25 μl 10% (m/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS) estoque (0,5% de concentração final) e 20 μl de 0,5 M ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) pH 8,0 (concentração final de 20 mM). Após incubação por 1 h a 60 °C, a amostra foi deixada resfriar até a temperatura ambiente (cerca de 22 °C).

O DNA foi purificado pela extração com fenol-clorofórmio e concentrado por precipitação com etanol, usando o protocolo *Phage DNA extract* do *Center for Phage Technology* (2018). Um volume igual de fenol: clorofórmio (1:1) foi adicionado e a amostra misturada invertendo o tubo várias vezes, suavemente. A amostra foi centrifugada a 3.000 rpm, 5 min, à temperatura ambiente e, em seguida, o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um novo tubo Eppendorf de 2 ml. As etapas de fenol: adição de clorofórmio e centrifugação foram repetidas. Após a transferência do sobrenadante para um novo tubo, foi adicionado igual volume de clorofórmio, a amostra foi misturada por inversão e centrifugada (3.000 rpm, 5 min, à temperatura ambiente). Em um tubo Falcon de 15 ml, 1/10 do volume de 3 M NaOAc.3H₂O (Vetec®, Brasil) (pH 7,5) e 2,5 volumes de etanol gelado (100%) foram adicionados ao sobrenadante transferido. Foi bem misturado e incubado a -20 °C durante a noite.

A amostra foi centrifugada em uma microcentrífuga de bancada em velocidade máxima por 20 min. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e o tubo foi preenchido até a metade com etanol 70% (v/v), com posterior centrifugação em

velocidade máxima. Uma segunda lavagem foi realizada com etanol 70% e uma nova centrifugação foi realizada. O máximo de etanol possível foi removido, tomando cuidado para não perturbar o sedimento, o qual foi dissolvido em tampão Tris-EDTA (TE) (~ pH 7,6).

4.8 Análise da sequência do genoma

O sequenciamento do genoma inteiro foi realizado na instalação da *NeoProspecta Microbiome Technologies* (Santa Catarina, Brasil) usando o *MiSeq Sequencing System* (Illumina Inc., EUA), com o kit *V2, 500 Cycles*, sequenciamento de extremidades pareadas (2 x 250 pb reads). As bibliotecas foram preparadas usando o *Nextera XT DNA Library Preparation Kit* (Illumina Inc., EUA). As leituras foram montadas com o *software* A5 (Coil *et al.*, 2015), processadas para recorte do adaptador, filtragem de qualidade e correção de erros para geração de *contigs* e *scaffolds*. Além disso, o *software* CAP3 (Huang & Madan, 1999) foi usado para melhorar a montagem, recortando regiões de baixa qualidade e corrigindo *links* errôneos entre *contigs*. Essas sequências de DNA genômico pré-montadas foram então anotadas usando a ferramenta de *software* Prokka (Prokka, 2014).

4.9 Análise da atividade antimicrobiana do fago

A atividade antibacteriana do fago foi avaliada por método colorimétrico, usando o Ensaio de Resazurina. Uma solução estoque de pó de sal de sódio de resazurina (Sigma Aldrich®) foi preparada a 0,01% (m/v) em água destilada estéril e armazenada a 4 °C. O teste foi realizado utilizando o método de diluição em caldo em microplaca de 96 poços, que utiliza solução de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-

ona-10-óxido) como indicador de crescimento bacteriano: a coloração azul/roxo indica nenhum crescimento bacteriano e rosa/incolor indica crescimento bacteriano (Loo *et al.*, 2018; Guerin *et al.*, 2001).

Os testes de atividade antimicrobiana levaram em consideração a multiplicidade de infecção (MOI), que é definida como a razão do número de fagos que infectam várias células hospedeiras bacterianas (Hyman, 2019). Deste modo, utilizou-se o seguinte cálculo para a MOI:

$$\frac{\text{Título do fago (PFU por ml)} \times \text{volume utilizado}}{\text{Número de células bacterianas (UFC por ml)}}$$

Para analisar o efeito inibitório do fago em *P. cichorii*, as culturas bacterianas foram preparadas incubando uma única colônia em TSB a 28 °C por 24 h. Em seguida, 1 ml da cultura bacteriana foi transferido para três tubos estéreis com 10 ml de TSB fresco cada e incubados durante a noite para crescer até a fase exponencial inicial (DO_{600 nm} 0,150). Em seguida, a cultura bacteriana foi misturada com solução do fago ($\approx 10^6$ PFU/mL) para MOI 1, a fim de permitir a adsorção das partículas do fago na superfície da bactéria. Após 10 min de interação, a solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 3 min. O sedimento foi lavado, centrifugado novamente e ressuspenso em 1 ml de TSB. A partir deste tubo, alíquotas de 180 µl foram colocadas em poços de uma placa de 96 poços. 50 µl foram usados para inocular 50 ml de TSB fresco (diluição 1.000 vezes) e, desta diluição, alíquotas de 180 µl foram colocadas na placa de 96 poços. A absorbância da cultura foi monitorada com espectrofotômetro (SpectraMax M2e, Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA), a cada hora durante 16 h, usando comprimento de onda de 600 nm. Como controle positivo, o meio TSB foi usado com meio MS e inóculo bacteriano; como controle negativo, apenas o meio TSB com o meio MS. Após o período de incubação de 16 h, foram adicionados 10 µl da solução de

resazurina nos poços e a densidade óptica ($DO_{600\text{ nm}}$) foi medida após uma hora. Os testes foram realizados em pelo menos triplicata, em dois experimentos isolados.

Para testar o efeito inibidor do fago sob diferentes MOI, três concentrações de culturas bacterianas foram testadas em diferentes diluições de fago (a concentração inicial do fago foi de 10^9 PFU/ml). Assim, 900 μ l de volume da diluição em série do fago (diluições em série de 10 vezes da solução estoque do fago em TSB, intervalo de 10^{-1} - 10^{-11}) foi adicionado a tubos Eppendorf de 1,5 ml. Em cada tubo foi adicionado o inóculo bacteriano (os MOI iniciais foram 0,1; 0,01 e 0,001), a fim de permitir a adsorção das partículas de fago na superfície da bactéria. Após 10 min de interação, todos os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 3 min. Os sedimentos foram lavados, centrifugados novamente e ressuspensos em 1 mL de TSB. Desse tubo, alíquotas de 180 μ L de cada tubo foram colocadas em poços de uma placa de 96 poços, que foi incubada a 28 °C por 24 h. Como controle positivo, o meio TSB foi usado mais meio MS e inóculo bacteriano; como controle negativo, apenas o meio TSB com meio MS. Após o período de incubação, foram adicionados 10 μ l da solução de resazurina nos poços e a densidade óptica ($DO_{600\text{ nm}}$) foi medida após uma hora. Os testes foram realizados em pelo menos triplicata, em dois experimentos isolados.

4.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias \pm DP. A análise estatística foi realizada no SPSS versão 20.0. Foram realizados testes de normalidade (Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk), One-way Analysis of Variance ANOVA, com teste *post hoc* de comparações múltiplas de Tukey. A significância da diferença foi considerada para incluir valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

5.1 Isolamento do fago

Os protocolos de isolamento e plaqueamento empregados foram adaptados com sucesso. O bacteriófago foi isolado da amostra sólida contendo uma mistura de folhas de alface, chicória e repolho, as quais apresentavam sintomas de doença bacteriana, como manchas necróticas marrom-escuras (**Figura 11A**). A presença de bacteriófago nas fontes de isolamento foi observada a partir da visualização de placas de lise na superfície da dupla camada de ágar contendo cultura ativa de *P. cichorii* (**Figura 11B**). A repetição dos protocolos de plaqueamento e propagação, no mínimo cinco vezes, com o isolamento de placas de lise individuais em cada repetição, foi suficiente para garantir o isolamento de um único bacteriófago, confirmado posteriormente através das análises genética.

O bacteriófago produziu dois tipos diferentes de morfologia de placa: placas grandes e claras com diâmetros de 3-4 mm com limites bem definidos, e placas pequenas e turvas com diâmetros de 1-2 mm e halos opacos (**Figura 11C**). A variação na morfologia da placa ocorreu regularmente e foi repetida quando placas individuais de tamanhos diferentes foram colhidas e plaqueadas repetidamente. Após as passagens de propagação, o bacteriófago isolado se mostrou estável, observado pela formação de placas de lise a cada passagem.

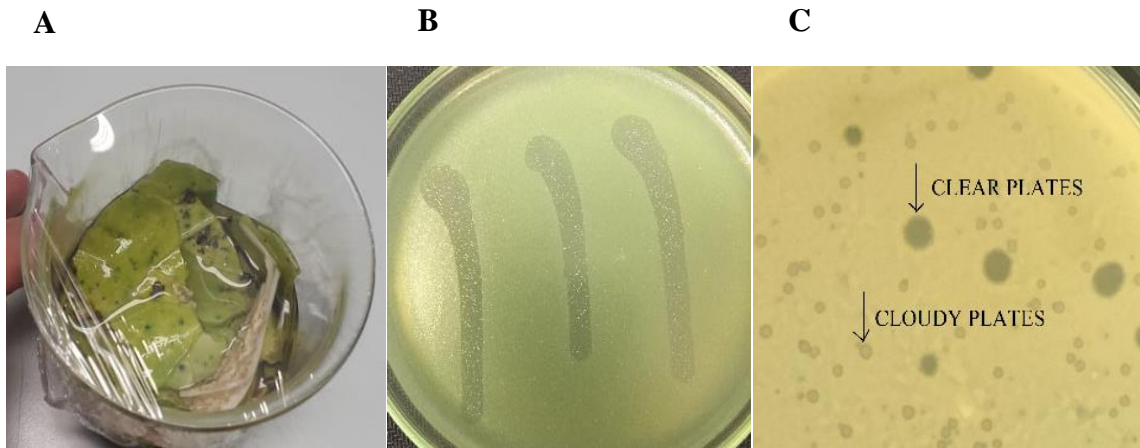


Figura 11. Placas formadas por fago em cultivo de *Pseudomonas cichorii* em placa com dupla camada de ágar. **A.** Amostra sólida utilizada para o isolamento do fago (folhas de alface, chicória e repolho). **B.** Teste de microgotas mostrando zonas de lise, indicando presença do fago. **C.** Morfologia das placas de lise formadas pelo fago.

5.2 Gama de hospedeiros

Para determinar a especificidade do hospedeiro (capacidade do fago de infectar outras bactérias), foram testadas outras bactérias fitopatogênicas descritas na literatura que causam doenças em vegetais folhosos, especificamente alface (*Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* sp. e *Pseudomonas fluorescens*). O fago não foi capaz de induzir a formação de placas de lise nas placas contendo as bactérias a serem testadas. Assim, as bactérias testadas não apresentaram suscetibilidade ao fago, exceto a *P. cichorii*.

5.3 Resistência térmica, sensibilidade ao pH e curva de crescimento de etapa única

O fago reteve quase 100% da atividade de infecção após incubação por 1 h em temperaturas variando de 5 a 45 °C. O título diminuiu drasticamente após 60 °C (~4 log), e a 90 e 100 °C não havia fagos viáveis (**Figura 12**).

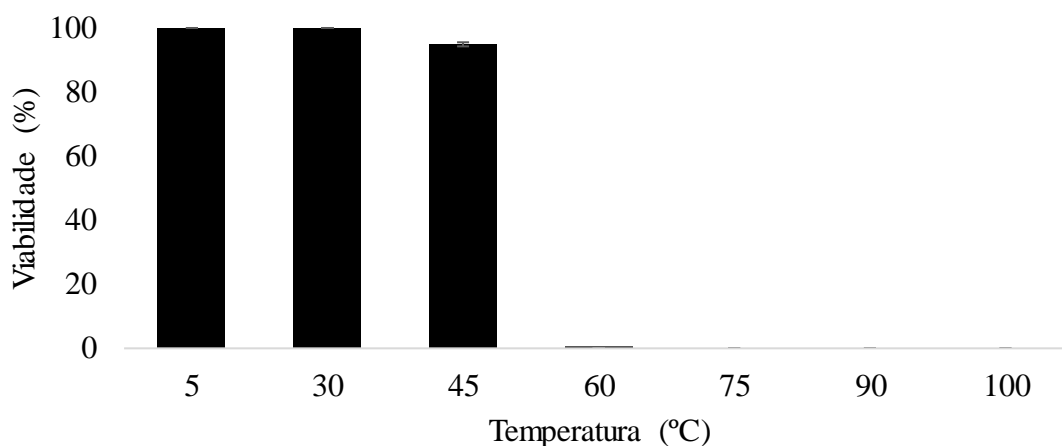


Figura 12. Teste de sensibilidade térmica do fago. Amostras foram testadas sob várias temperaturas (5, 30, 45, 60, 75, 90 and 100 °C) por 1 h antes de determinar o número de partículas de fagos ativas.

A estabilidade máxima do fago foi observada em pH ideal 7,5. O fago permaneceu estável na faixa de pH de 5,0 a 8,5, reduzindo em título em pH 3,0 e 11,0.

(Figura 13).

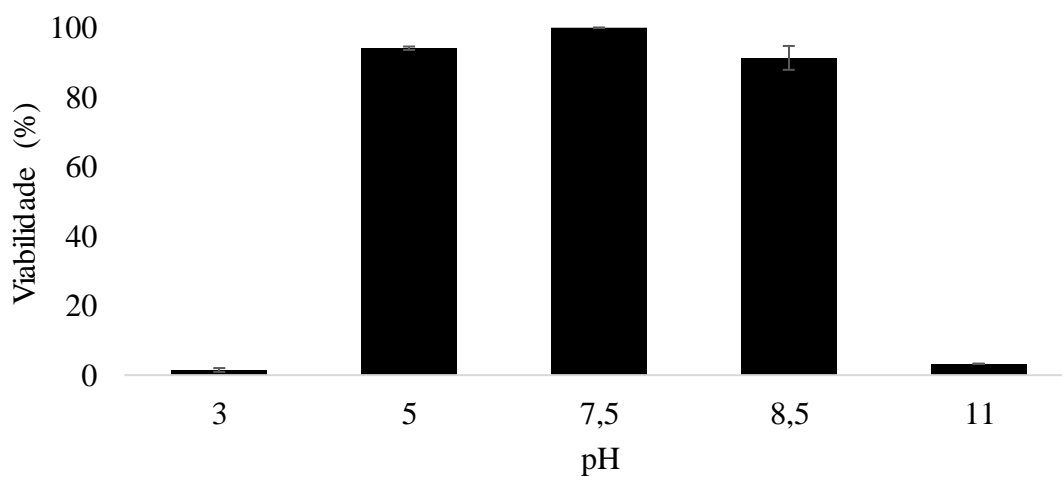


Figura 13. Teste de estabilidade em pH. Amostras contendo fago foram incubadas por 1 h sob diferentes condições de pH antes de determinar o número de partículas ativas de fago.

Um experimento de curva de crescimento de uma etapa foi realizado para determinar o período latente e o tamanho do *burst* do fago. A partir dos dados, o período de tempo latente foi calculado em 60 min e o fago tem um tamanho de explosão médio de cerca de 151 partículas de fago por célula infectada após 130 min a 28 °C (Figura 14).

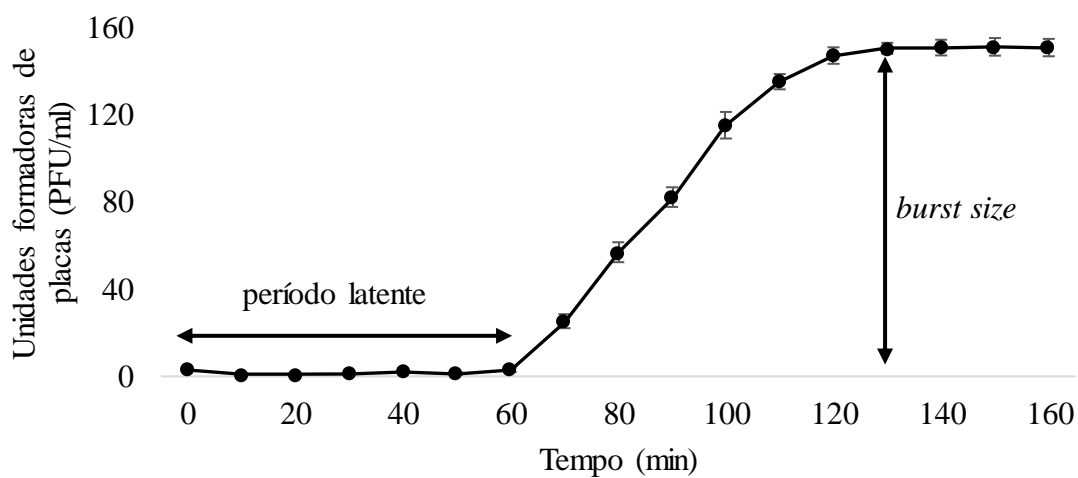


Figura 14. Curva de crescimento de etapa única. O período latente, definido como o tempo entre a absorção e o início do primeiro *burst*, foi de aproximadamente 60 min. O *burst size*, calculado como a razão entre a contagem final de partículas de fago liberadas e a contagem inicial de células bacterianas infectadas durante o período latente, foi de cerca de 151 (± 2) PFU/célula.

5.4 Estocagem a baixa temperatura

A estocagem de fagos é um ponto sensível, pois manter a viabilidade de vírus durante longos períodos de tempo é uma característica muito importante, particularmente para aqueles com potencial utilização terapêutica. Deste modo, a manutenção do fago para os testes se deu em meio SM, a 4°C, com reativações periódicas dos estoques. Desta forma, o fago permaneceu estocado por aproximadamente um ano, de forma satisfatória, com fácil reativação após este período.

Testou-se, então, a sensibilidade do fago à estocagem a baixa temperatura (congelamento). O fago purificado com um título elevado ($>10^{12}$ PFU/ml) manteve-se viável após armazenamento a temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 36 semanas, independentemente da concentração de glicerol (10%, 20% ou 30%). Houve formação de áreas de lise bastante visíveis e, após ser repicado para outra placa contendo TSB-SA e *P. cichorii*, o fago mostrou-se infectante (**Figura 15**).

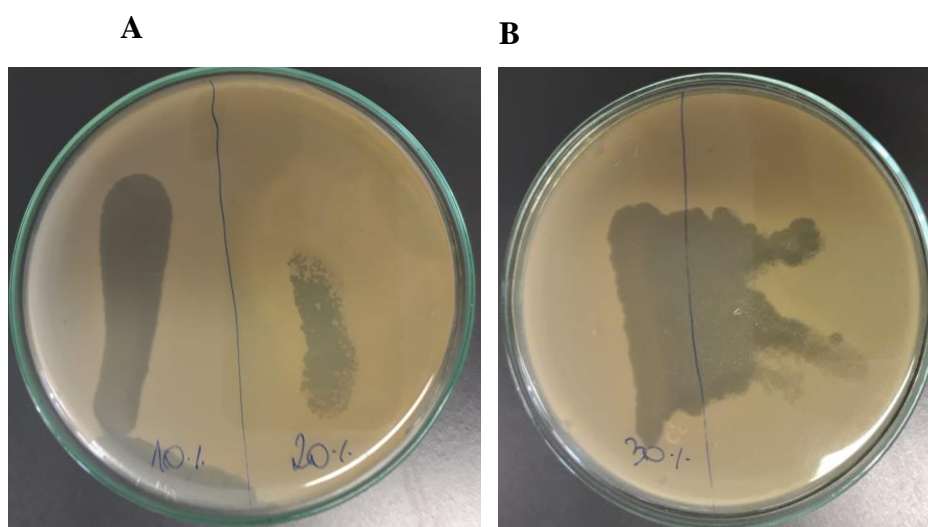


Figura 15. Teste de estocagem de fago a temperatura muito baixa ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), sob diferentes concentrações de glicerol (A. 10% e 20%; B. 30%) após 36 semanas. Houve formação de áreas bastante visíveis de lise no teste de congelamento.

5.5 Caracterização do fago isolado

O genoma do fago foi digerido pela enzima DNase e não pela RNase, indicando que é um fago de DNA, confirmado pelo posterior sequenciamento. O bacteriófago carrega DNA genômico dupla-fita linear de 40.117 pares de bases (pb) com 49 *open reading frames* (ORFs) e uma redundância terminal de 127 pb (**Figura 16**).

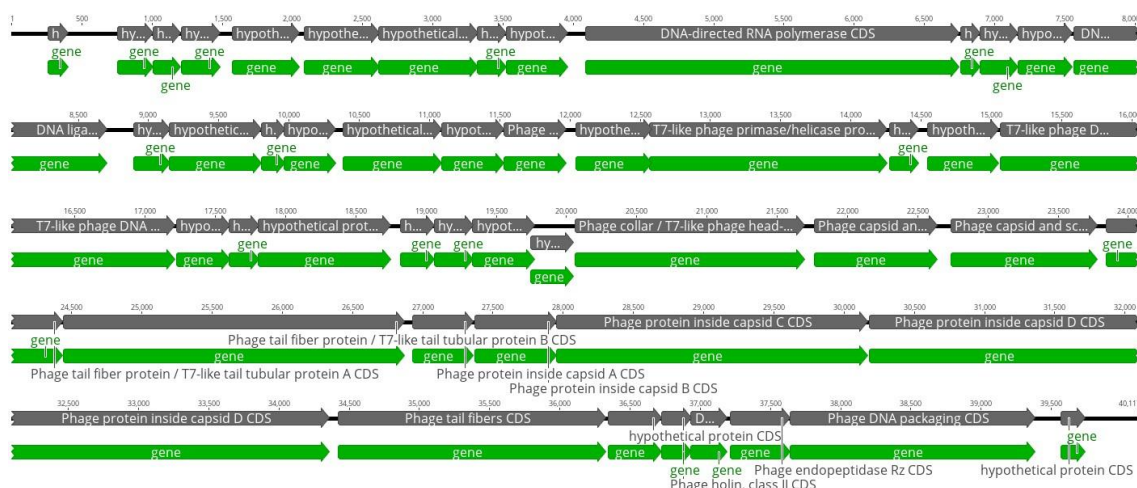


Figura 16. Genoma do fago: DNA genômico contendo 40.117 pb, com 49 *open reading frames* e redundância terminal de 127 pb.

O fago está classificado na seguinte linhagem: Reino Viruses; Domínio Duplodnaviria; Clado Heunggongvirae; Filo Uroviricota; Classe Caudoviricetes; Ordem Caudovirales; Família *Podoviridae*; subfamília *Autographiviridae* - *Studiervirinae*; Gênero *Ghunavirus*. Na mesma linhagem estão os fagos de *Pseudomonas* virus 17A, gh1, Henninger, KNP, Pfl1ERZ2017, ΦPsa17, ΦPSA2, PPPL1, shl2 e WRT.

A **Tabela 8** apresenta os principais genes codificados pelo fago isolado. São vinte e quatro ORFs anotadas funcionalmente e vinte e cinco ORFs anotadas como proteínas hipotéticas. O fago compartilha 3 ORFs com os vírus de *pseudomonas* WRT e KNP; 12 ORFs com ΦPSA2; 7 ORFs com ΦPsa17 e 23 ORFs com gh-1. Apresenta uma ORF única que não mostra homologia com nenhum fago.

Tabela 8. Genes codificados pelo fago isolado.

| ORF | Function | Similarity | GenBank |
|-----|----------------------|----------------------------------|----------------|
| 1 | Hypothetical protein | No significant similarity | - |
| 2 | Hypothetical protein | Hypothetical protein of ΦPSA2_01 | P_009043229.1 |
| 3 | Hypothetical protein | Hypothetical protein of ΦPSA2_02 | YP_009043230.1 |
| 4 | Hypothetical protein | Hypothetical protein of | AKG94346.1 |

| | | | |
|----|--|--|-----------------|
| | | ΦPsa17 | |
| 5 | Hypothetical protein | Hypothetical protein of KNP_004 | ARM69617.1 |
| 6 | Hypothetical protein | Hypothetical protein of KNP_004 | ARM69618.1 |
| 7 | Hypothetical protein | Hypothetical protein of ΦPSA2_05 | YP_009043233.1 |
| 8 | Hypothetical protein | Hypothetical protein of VO98_040 of ΦPsa17 | AKG94350.1 |
| 9 | Hypothetical protein | Hypothetical protein of KNP_008 | ARM69621.1 |
| 10 | DNA-directed RNA polymerase | ΦPsa17 | AKG94352.1 |
| 11 | Hypothetical protein | Hypothetical protein of gh-1 | NP_813748.1 |
| 12 | Hypothetical protein | Hypothetical protein of ΦPSA2 | YP_009043237.1 |
| 13 | Hypothetical protein | Hypothetical protein of gh-1p | NP_813750.1 |
| 14 | DNA ligase | ΦPsa17 | AKG94356.1 |
| 15 | Hypothetical protein | Hypothetical protein of ΦPSA2_13 | YP_009043241.1 |
| 16 | Hypothetical protein | Hypothetical protein VO98_080 of ΦPsa17 | AKG94358.1 |
| 17 | Putative host RNA-polymerase inhibitor | Phage gh-1 | NP_813754.1 |
| 18 | Hypothetical protein | Hypothetical protein of Phage gh-1p09 | NP_813755.1 |
| 19 | Single-stranded DNA-binding protein | Phage gh-1 | NP_813756.1 |
| 20 | Endonuclease | Phage gh-1 | NP_813757.1 |
| 21 | Lysozyme | Phage gh-1 | NP_813758.1 |
| 22 | Hypothetical protein | Hypothetical protein of ΦPSA2_20 | YP_009043248.1 |
| 23 | Putative primase/helicase | Putative primase/helicase ΦPSA2 | YP_009043249.1 |
| 24 | Hypothetical protein | Hypothetical protein of gh-1p16 | NP_813762.1 |
| 25 | Hypothetical protein | Hypothetical protein of gh-1p17 | NP_813763.1 |
| 26 | Putative DNA polymerase | Putative DNA polymerase ΦPSA2 | YP_009043252.1) |
| 27 | Hypothetical protein | Hypothetical protein of gh-1p19 | NP_813765.1 |
| 28 | Hypothetical protein | Hypothetical protein of gh-1p20 | NP_813766.1 |
| 29 | Exonuclease | Exonuclease phage gh-1 | NP_813767.1 |
| 30 | Hypothetical protein | Hypothetical protein of gh-1p22 | NP_813768.1 |

| | | | |
|----|--------------------------------------|---|----------------|
| 31 | Hypothetical protein | Hypothetical protein of Φ PSA2_29 | YP_009043257.1 |
| 32 | Hypothetical protein | Hypothetical protein VO98_160 of Φ Psa17 | AKG94374.1 |
| 33 | Tail assembly protein | Tail assembly protein phage gh-1 | NP_813771.1 |
| 34 | Head-tail connector protein | Head-tail connector protein phage gh-1 | NP_813772.1 |
| 35 | Capsid assembly protein | Capsid assembly protein phage gh-1 | NP_813773.1 |
| 36 | Major capsid protein | Major capsid protein phage gh-1 | NP_813774.1 |
| 37 | Tail tubular protein A | Tail tubular protein A phage gh-1 | NP_813775.1 |
| 38 | Tail tubular protein B | Tail tubular protein B virus WRT | ARM69601.1 |
| 39 | Internal virion protein A | Internal virion protein A phage Φ Psa17 | AKG94381.1 |
| 40 | Internal virion protein B | Internal virion protein B phage gh-1 | NP_813778.1 |
| 41 | Internal virion protein C | Internal virion protein C phage Φ PSA2 | YP_009043267.1 |
| 42 | Internal virion protein D | Internal virion protein D phage gh-1 | NP_813780.1 |
| 43 | Tail fiber protein | Tail fiber protein virus WRT | ARM69606.1 |
| 44 | Hypothetical protein | Hypothetical protein virus WRT | ARM69607.1 |
| 45 | Type II holin | Phage Φ PSA2 | YP_009043271.1 |
| 46 | DNA packaging protein, small subunit | DNA packaging protein, small subunit phage gh-1 | NP_813784.1 |
| 47 | Rz-like lysis protein | Phage Φ PSA2 | YP_009043273.1 |
| 48 | DNA packaging protein B | DNA packaging protein B phage gh-1 | NP_813786.1 |
| 49 | Hypothetical protein | Hypothetical protein of gh-1 p42 | NP_813788.1 |

A classificação funcional do genoma do bacteriófago mostrou que o vírus sequenciado apresentou genes produtores de proteínas líticas. A **Tabela 9** apresenta a classificação funcional de algumas das proteínas produzidas pelos genes do fago isolado.

Tabela 9. Classificação funcional das proteínas produzidas pelos genes do fago isolado.

| Função | ORF | Proteína |
|--|-------------------------|--|
| Estrutural | 33 | Tail assembly protein |
| | 34 | Head-tail connector protein |
| | 35 | Capsid assembly protein |
| | 36 | Major capsid protein |
| | 37 | Tail tubular protein A |
| | 38 | Tail tubular protein B |
| | 39 | Internal virion protein A |
| | 40 | Internal virion protein B |
| | 41 | Internal virion protein C |
| | 42 | Internal virion protein D |
| | 43 | Tail fiber protein |
| Síntese, empacotamento, recombinação e reparo de DNA | 10 | DNA-directed RNA polymerase |
| | 14 | DNA ligase |
| | 17 | putative host RNA-polymerase inhibitor |
| | 19 | Single-stranded DNA-binding protein |
| | 20 | Endonuclease |
| | 23 | Putative primase/helicase |
| | 26 | Putative DNA polymerase |
| | 29 | exonuclease |
| | 46 | DNA packaging protein, small subunit |
| 48 | DNA packaging protein B | |
| Lise | 21 | Lysozyme |
| | 45 | Type II holin |
| | 47 | Rz-like lysis protein |

Através da análise dos dados, o fago mostrou ser geneticamente semelhante a outros fagos de *Pseudomonas*, compartilhando homologia acima de 90% com WRT (94,6%; Acesso GenBank nº KY798120), ΦPSA2 (92,7%; Acesso GenBank nº KJ507099), ΦPsa17 (92,3%; Acesso GenBank nº KR091952) e vírus KNP (91,7%; Acesso GenBank nº KY798121), e compartilha menor homologia (85,1%) com o fago gh-1 (Acesso GenBank nº AF493143) (Figura 17).

Os dados foram depositados no GenBank sob o número de acesso a ser determinado, contendo anotação da sequência completa do genoma do fago (**ANEXO 1**). Para identificar o bacteriófago isolado neste estudo, adotou-se parcialmente uma norma de nomenclatura sugerida na literatura, mas não adotada oficialmente (Ackermann e Abedon, 2000). No GenBank, o fago foi submetido com a denominação

vB_Pci_PCMW57. No presente estudo denominaremos apenas de PCMW57 (**Figura 17**).

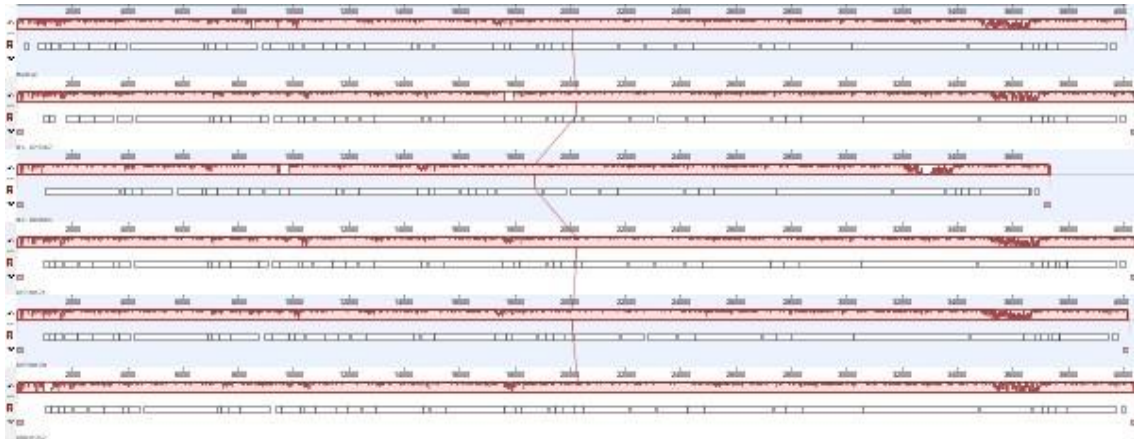


Figura 17. Análise comparativa aos genomas dos fagos ΦPSA2, gh-1, KNP, WRT e ΦPsa17.

5.6 Atividade antimicrobiana do fago

A **Figura 18** mostra as taxas de crescimento do *P. cichorii* na presença e na ausência do fago PCMW57. Na presença de fago, houve crescimento da bactéria no período de 5 h, similar ao crescimento bacteriano na ausência do fago. Entretanto, após este período de 5 h, percebe-se declínio do crescimento, praticamente atingindo os valores basais após 9 h de incubação.

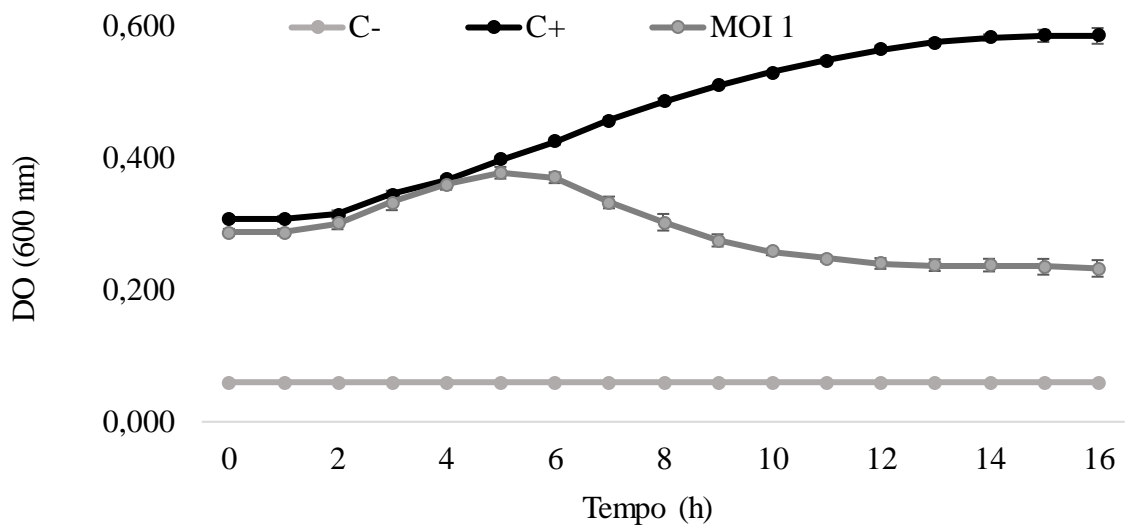


Figura 18. Atividade antimicrobiana do fago PCMW57: curva de crescimento de *P. cichorii* na presença (MOI 1) e ausência do fago. C-: controle negativo; C+: controle positivo.

Além disso, a **Figura 19** mostra curvas regulares de crescimento bacteriano na ausência e na presença de fago PCMW57 após diluição 1.000 vezes em meio TSB. Na ausência de fago, o crescimento bacteriano começa após 5 horas de incubação. Por outro lado, na presença do fago, o crescimento da bactéria foi completamente inibido.

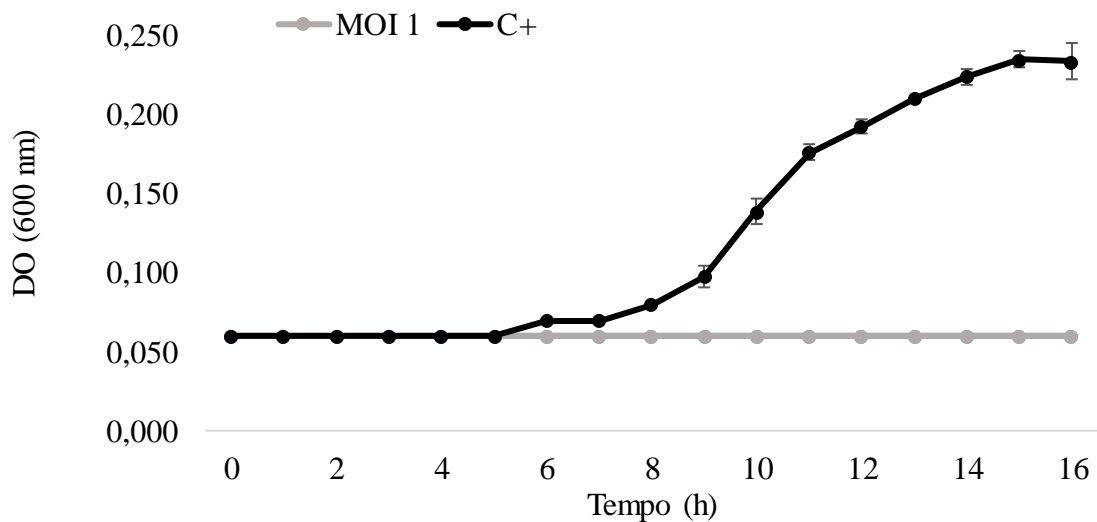


Figura 19. Atividade antimicrobiana do fago PCMW57: curva de crescimento bacteriano na presença (MOI 1, diluição de 1.000 vezes) e na ausência do fago PCMW57. C+: controle positivo.

O método colorimétrico empregando resazurina foi usado para avaliar a viabilidade celular de *P. cichorii* na presença do fago PCMW57 (em MOI 1 e MOI 1 após diluição de 1.000 vezes). A **Figura 20** mostra que na presença do fago, houve inibição do crescimento bacteriano.

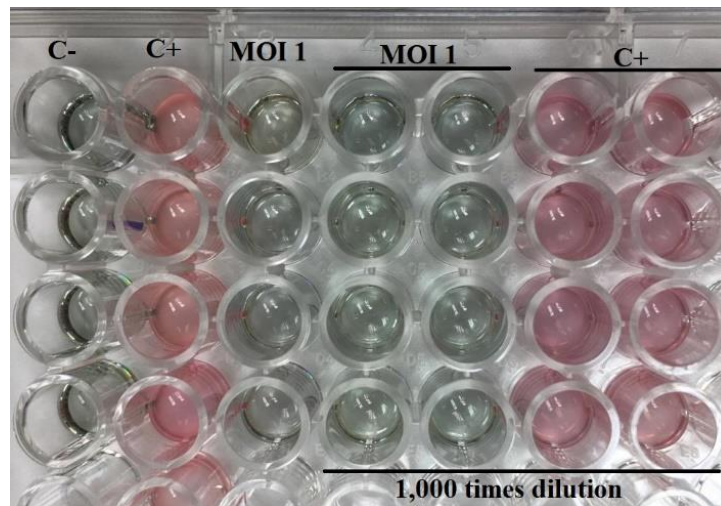


Figura 20. Atividade antibacteriana avaliada por método colorimétrico usando o Ensaio com Resazurina. Azul/roxo indica crescimento bacteriano ausente e rosa indica crescimento bacteriano. C-: negative control. C+: positive control.

A capacidade do fago para lisar *P. cichorii* sob diferentes MOI iniciais foi testada usando o ensaio de resazurina. O resultado revelou que há atividade lítica efetiva até a diluição máxima, visto que, nas concentrações de fagos nas diluições 10^{-1} e $1/10^{-2}$, os valores obtidos na leitura da DO com espectrofotômetro foram equivalentes estatisticamente aos encontrados no controle negativo (**Figura 21**).

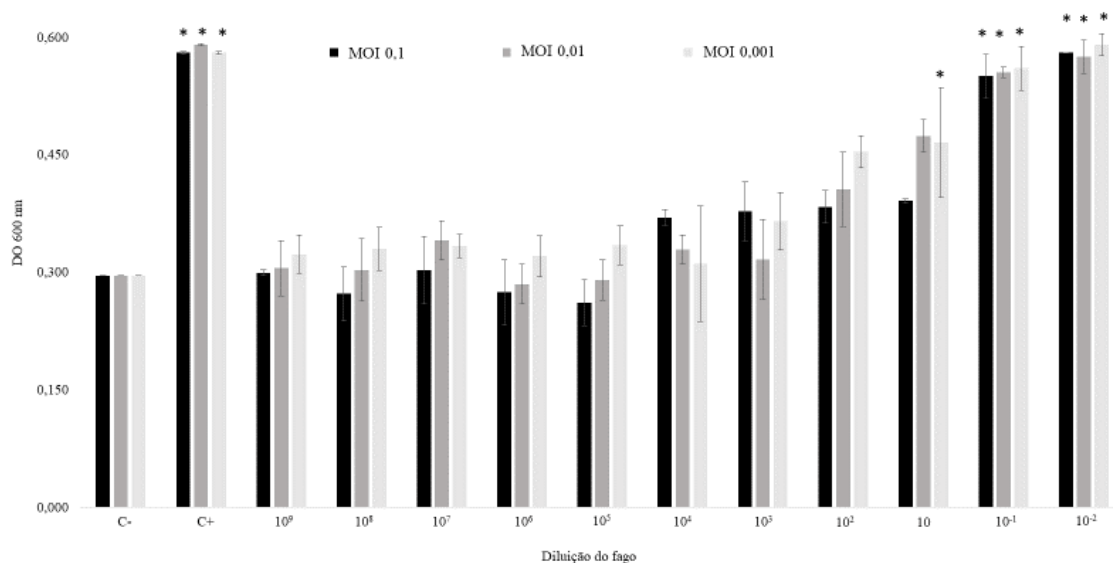


Figura 21. Atividade antimicrobiana do fago vB_Pci_PCMW57 sob diferentes MOI iniciais (0,1, 0,01, 0,001) e após diluição seriada do fago. C-: controle negativo; C+: controle positivo. A análise da significância estatística considerou valor- $p < 0,05$.

No teste colorimétrico com resazurina, foi observada mudança de cor na diluição 10^3 no MOI inicial 0,1 e 0,001 e 10^4 no MOI inicial 0,01 (**Figura 22**). A capacidade de lisar as bactérias foi inversamente proporcional ao aumento da diluição do fago.

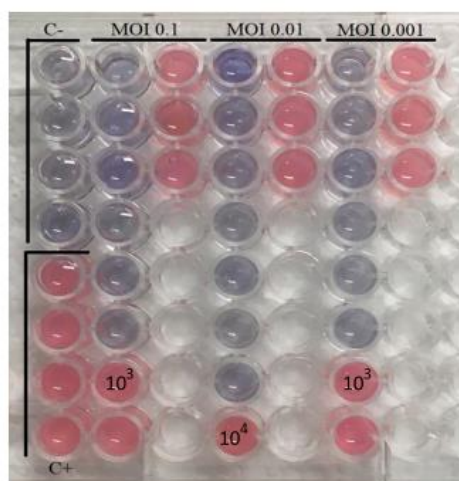


Figura 22. Atividade antibacteriana avaliada através de método colorimétrico, usando resazurina. Azul/roxo indica ausência de crescimento bacteriano e rosa indica crescimento ou atividade bacteriana. C-: controle negativo; C+: controle positivo.

A **Figura 23** resume a atividade antimicrobiana do fago sob MOI 1; 0,1; 0,01 e 0,001. Nesse caso, a análise estatística mostrou que houve diferença na leitura da DO dos diferentes MOI quando comparados ao controle negativo (ou seja, a DO foi estatisticamente superior) e quando comparados ao controle positivo (ou seja, a DO foi estatisticamente inferior). O MOI 0,1; 0,01 e 0,001 não apresentaram diferença estatística entre si.

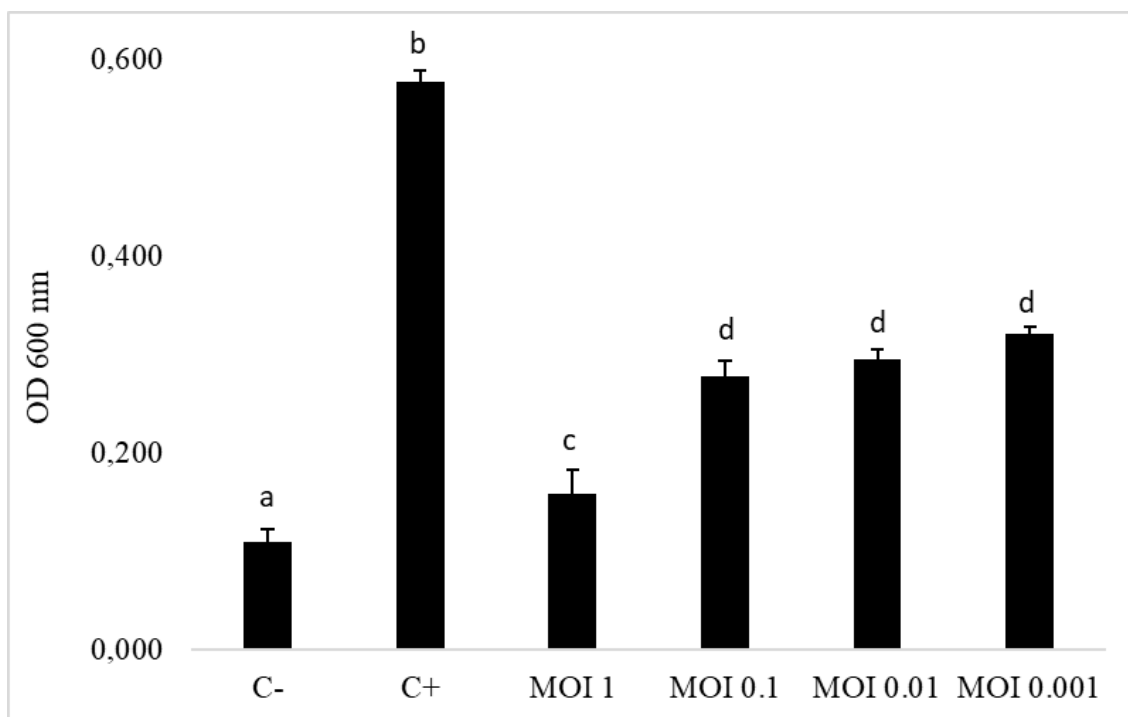


Figura 23. Atividade antimicrobiana do fago vB_Pci_PCMW57 sob diferentes MOI iniciais (1, 0.1, 0.01, 0.001). A análise da significância estatística considerou valor- $p < 0,01$. Letras diferentes mostram diferenças estatísticas.

5. DISCUSSÃO

Bacteriófagos são vírus que infectam apenas células bacterianas. As evidências científicas disponíveis na literatura sobre os fagos indicam seu devido potencial, reconhecendo-os como importantes ferramentas biológicas em diversas áreas e aplicações, tais como na terapia com função de antibiótico, no controle de bactérias em alimentos e também em infecções humanas, prevenção da formação e na redução de biofilme, entre outros.

A capacidade dos fagos em lisar especificamente determinadas bactérias, pode ser aplicada em estratégias que atendam à demanda do consumidor por tecnologias que combatam os patógenos mantendo a qualidade dos alimentos, especialmente aqueles *in natura* e minimamente processados, tais como os vegetais folhosos. Assim, de modo a combater as bactérias, pode-se manipular esses vírus bacterianos para controlar e detectar patógenos bacterianos em alimentos, bem como na medicina e veterinária.

A proposta neste presente estudo foi utilizar o fago no controle de fitobactérias, especialmente a *P. cichorii*, com a perspectiva de uso na agricultura, tanto na prevenção da contaminação das sementes quanto no período pós-colheita. Estudos como este são de extrema importância, uma vez que os patovares de *Pseudomonas syringae* figuram o grupo de fitobactérias que aparece como o mais forte em bases científicas e econômicas em termos de importância, ou seja, em um “Top 10” das principais bactérias patogênicas de plantas, são consideradas “Número 1” (Mansfield *et al.*, 2012). A proposta se deu pelo fato de que perdas na produção de safras devido a doenças, especialmente as bacterianas, precisam ser reduzidas, independentemente do momento da cadeia produtiva, através de estratégias corretas de controle ambiental, de modo a atender à crescente demanda global de alimentos associada ao crescimento da população humana. Medidas de controle que envolvem o uso de produtos químicos

tradicionais (agrotóxicos) ou antibióticos são reconhecidamente prejudiciais ao meio ambiente e aos seres humanos, além de desenvolver, naturalmente, a resistência bacteriana a esses agentes ao longo dos anos.

No estudo atual, um bacteriófago que pode lisar *P. cichorii* de forma eficiente foi isolado de amostras sólidas (alface, chicória e repolho). Utilizando a regra “para encontrar bacteriófagos olhe onde está o hospedeiro”, as folhas de alface, chicória e repolho utilizadas neste estudo apresentaram sintomas de doenças bacterianas, como manchas marrons e pretas, semelhantes aos sintomas de doenças causadas por *P. cichorii* descritos na literatura. No entanto, encontrar um fago contra um determinado hospedeiro pode não ser tão fácil (Hyman, 2019). Neste estudo foi isolado um único fago, o qual mostrou potencial para ser usado como agente de biocontrole contra essa bactéria.

Foram caracterizados o diâmetro e a turbidez das placas formadas pelo fago PCMW57 e encontradas duas morfologias distintas: placas claras, típicas para fagos líticos e virulentos, e placas turvas, que podem indicar sua capacidade de lisar células hospedeiras, fagos temperados. “Placas em olho de boi”, com manchas ou anéis de crescimento no meio de regiões claras de lise completa, são geradas por fagos parcialmente lisogênicos, ou cepas que matam apenas uma fração de seus hospedeiros ou apenas reduzem a taxa de crescimento celular (Jurczak- Kurek *et al.*, 2016). A morfologia de placa turva foi observada anteriormente entre os fagos T-7 (Abedon, 2009). Entretanto, a despeito da dupla morfologia de placas de lise, com formação de placas turvas, a análise genômica do fago PCMW57 comprovou que se trata de um vírus lítico, uma vez que apresenta enzimas líticas específicas para a bactéria alvo.

O fago isolado mostrou-se estável após sucessivas passagens de propagação nas condições *in vitro*, sendo esta uma característica importante para a sua utilização como

ferramenta biotecnológica para o controle de doenças. A resistência dos fagos é importante para uso como agentes de controle biológico, pois a atividade lítica dos bacteriófagos deve ser estável em condições ambientais. Neste contexto, a temperatura desempenha um papel importante no ciclo de reprodução do bacteriófago, como fixação, penetração, multiplicação e a duração do período latente (Jończyk *et al.*, 2011) e afeta a capacidade de sobrevivência do bacteriófago (Olson *et al.*, 2004). Os resultados deste estudo indicam que o PCMW57 é sensível a altas temperaturas (acima de 45 °C), apresentando sensibilidade térmica muito semelhante ao fago de *Pseudomonas* PPPL-1 (GenBank Accession nº KU064779) (Park *et al.*, 2018). Aqui não falar sobre ciclo de vida mas sim estabilidade de frente temp;

Por sua vez, o pH é outro fator importante que influencia a estabilidade do fago. O fago PCMW57 é sensível a pH extremo, ao contrário do fago PPPL-1, que se mostra estável na faixa de pH 3 a 11 (Park *et al.*, 2018). Porém, em condições ambientais naturais, as temperaturas dificilmente ultrapassam 45 °C e o pH do solo, que é influenciado por diversos fatores, geralmente varia entre 4,3 e 7,4 (Nicolodi *et al.*, 2008; Leite *et al.*, 2011). Considerando que os fagos podem se estabelecer em ambientes extremos (Jończyk *et al.*, 2011), os resultados apresentados sugerem que o fago PCMW57 sobreviveria quando aplicado em ambiente natural e pode ter aplicações de biocontrole potenciais para *P. cichorii*.

No presente estudo, os bacteriófagos apresentaram capacidade de lisar as bactérias e se mantiveram viáveis após exposição a fatores extrínsecos, como diferentes faixas de pH e aumento de temperatura. Na temperatura em que as células bacterianas são metabolicamente mais ativas (no caso da *P. cichorii*, cerca de 28 °C), os bacteriófagos mantiveram 100% de sobrevivência e foram capazes de lisar as células bacterianas de modo muito eficiente. Isso ocorre porque a reprodução de bacteriófagos é

dependente dos processos bioquímicos do hospedeiro célula bacteriana: temperatura mais baixa (como a de armazenamento a 4 °C), diminui o metabolismo bacteriano, e conseqüentemente, haveria provavelmente um período de latência aumentado (Liu *et al.*, 2015).

Alguns bacteriófagos apresentam características biológicas incomuns, como a capacidade de sobreviver na presença de solventes orgânicos (Jurczak-Kurek *et al.*, 2016), como o clorofórmio, que é indicado em alguns estudos para preservar bacteriófagos a 4 °C (Clokic, Kropinski, 2009). Por se tratar de um fago desconhecido, inicialmente fez-se o uso do clorofórmio, o que resultou em inativação e perda dos fagos, devido a instabilidade do fago PCMW57 na presença do reagente. O clorofórmio não deve ser usado para estes fins, porque inativa um terço da cauda e todos os fagos contendo lipídeos e filamentosos (Jończyk *et al.*, 2011). Deste modo, para a preservação do bacteriófago, utilizou-se meio SM (pH 7,5) sob refrigeração (4 °C), permanecendo estável sem alteração no título por até um ano, e meio SM com 10%, 20% e 30% (v/v) de glicerol a -20 °C durante 36 semanas. Como o presente estudo mostrou a possibilidade do congelamento do fago, os pesquisadores pretendem manter um banco de fagos para estudos futuros. Pretende-se investigar a possibilidade da manutenção, ou seja, a garantia da estabilidade e infecciosidade do fago, a -80 °C e em nitrogênio líquido, o que já foi testado em outros fagos (Ackermann *et al.* 2004; Olson *et al.* 2004; Mullan, 2001). Colocar nos materiais e métodos que sou o clorformio e o que resultou disso (sensibilidade).

A maioria dos fagos têm ótima estabilidade em pH variando de 6 a 8 e temperatura de armazenamento de cerca de 4 °C (Jończyk *et al.*, 2011), o que foi mostrado também para o fago PCMW57. Para estudos posteriores, nos quais será

utilizado o fago nas plantas (*in vivo*) pretende-se manter o fago armazenado em temperatura de refrigeração (4 °C), em meio SM, pH 7,5.

O ciclo de reprodução dos fagos pode ser caracterizado por experimentos de crescimento de uma etapa, que medem o período latente e o tamanho do *burst* de um determinado fago em um determinado hospedeiro. Estes são parâmetros essenciais em uma descrição das propriedades do fago (Middleboe *et al.*, 2010). O período latente e o tamanho do *burst* variam entre os fagos e os hospedeiros e com as condições de crescimento do hospedeiro (Middleboe *et al.*, 2010), como a taxa de crescimento do hospedeiro e a disponibilidade de nutrientes (Middleboe, 2000). Outro aspecto importante, a curva de uma etapa depende do MOI. Um MOI mais alto aumenta a chance de uma bactéria ser infectada por mais de um fago. Por este motivo, sugere-se o uso de MOI em uma faixa de 0,1 e 0,01 (Middleboe *et al.*, 2010). Mas MOI não é uma característica intrínseca de nenhum fago e pode ser alterado por alterações nas condições ambientais (Hyman, 2019). somente *in vitro* *in vivo* aumentar o MOI

Quando comparados a outros fagos de *Pseudomonas*, houve diferença no período de latência dos fagos, que variou de 15 min (Φ PSA2) a 100 min (fagos Φ 6 e Φ PSA1) (Di Lallo *et al.*, 2014; Pinheiro *et al.*, 2019). Além disso, houve diferença no tamanho do *burst* dos fagos. Φ PSA2, um fago lítico com uma gama de hospedeiros mais ampla, tem um tamanho de *burst* de 92 PFU/célula infectada, enquanto Φ PSA1, um fago temperado com uma gama de hospedeiros estreita, tem um tamanho de *burst* de 178 PFU/célula infectada (Di Lallo *et al.*, 2014). Outro fago de *Pseudomonas*, o gh-1 infecta *P. putida* e tem um tamanho de *burst* de 103 PFU/célula infectada (Lee, Boezi, 1966). O tamanho do *burst* do fago Φ 6, que infecta *P. syringae* pv. *actinidiae*, é 60 ± 1 PFU/célula hospedeira (Pinheiro *et al.*, 2019). As características de crescimento do fago

PCMW57 mostraram um tamanho de *burst* relativamente alto (~151 PFU/célula hospedeira), indicando que ele se replica de forma eficiente em *P. cichorii*.

Os fagos líticos variam em muitas propriedades, como duração da infecção, número de progênies produzidas e, de especial importância para a terapia fágica, a gama de hospedeiros (Hyman, 2019). Alguns fagos de *Pseudomonas* têm uma ampla variedade de hospedeiros, como o fago ΦPsa17 (Frampton *et al.*, 2015). Outros, têm hospedeiros específicos, como o fago PPPL-1, específico para espécies de *P. syringae* (Park *et al.*, 2018). O fago isolado PCMW57 não foi capaz de induzir a formação de placas em outras cepas de bactérias além de *P. cichorii*, que era o alvo de interesse. A gama de hospedeiros de um bacteriófago é definida por quais gêneros, espécies e cepas bacterianas ele pode lisar (Kutter, 2009). Uma gama de hospedeiros limitada a uma única espécie é desejável, porque uma infecção a ser tratada por fago-terapia é uma infecção por uma única espécie de bactéria (Hyman, 2019). Esta é uma das principais vantagens do uso de bacteriófagos: a capacidade de alguns fagos de atingir bactérias de certas cepas ou espécies, evitando que o fago mate outras espécies, bem como sua propagação autolimitada, que é controlada pela disponibilidade de um hospedeiro sensível (Lobockai *et al.*, 2014). Em vírus da ordem Caudovirales, a qual pertence o PCMW57, a gama de hospedeiros também pode ser definida pela coevolução das fibras da cauda do fago e dos receptores bacterianos, os quais determinam ainda mecanismos de entrada de fago e outros parâmetros de infecção (Chaturongakul & Ounjai, 2014).

Até o momento, aproximadamente 8.300 genomas completos de bacteriófagos foram sequenciados e cerca de 400 foram isolados de membros de *Pseudomonas*, fornecendo fonte valiosa para investigação sobre a diversidade e complexidade dos fagos que infectam o gênero (Ha & Denver, 2018). O sequenciamento completo do genoma de um bacteriófago é um pré-requisito essencial para qualquer tipo de estudo

genômico funcional, bem como para a aprovação regulatória para biocontrole baseado em fago (Klumpp *et al.*, 2013). Comparações genômicas do fago PCMW57 com fagos previamente sequenciados indicaram que quase todos os genes previstos têm homólogos em outros vírus da subfamília Autographiviridae que infectam *Pseudomonas* spp. Estudo de Ha & Dever (2018) sugere que há um reservatório de gene amplamente inexplorado de fagos de *Pseudomonas*, com muitos homólogos potenciais com sequências de fago não documentadas na natureza.

O fago PCMW57 é mais homólogo ao WRT (acesso do GenBank nº KY798120), descrito por Nowicki *et al.* (2017), que infectam bactérias do grupo *P. fluorescens* e pertencem ao gênero T7-vírus. Existem pequenas diferenças entre os genomas do fago PCMW57 e WRT: de acordo com as estatísticas da sequência de nucleotídeos, existem 38.345 pb idênticas. As diretrizes do Comitê de Taxonomia de Vírus (ICTV) recomendam uma identidade de sequência de DNA de 95% como um limite para o delineamento de espécies. O fago PCMW57 compartilha homologia abaixo de 95% com outros fagos de *Pseudomonas*. Portanto, pode ser considerado um candidato a um novo vírus. Neste contexto, a identificação morfológica do fago isolado também constitui uma etapa importante para reconhecer e confirmar as características deste bacteriófago.

O genoma do fago PCMW57 é menor que o genoma dos fagos de *Pseudomonas* 17A (40.242 pb, GenBank nº LN889995), WRT (40.214 pb, GenBank nº KY798120), ΦPSA2 (40.472 pb; GenBank nº KJ507099), PPPL-1 (41.149 pb, GenBank nº KU064779), ΦPsa17 (40525 pb, GenBank nº KR091952), shl2 (40.466 pb, GenBank nº NC048200), KNP (40.491 pb, GenBank nº KY798121), Henninger (40.923 pb, GenBank nº NC047922) e maior que o genoma dos fagos gh-1 (37.359 pb, GenBank nº AF493143) e Pfl ERZ 2017 (39.195 pb, GenBank nº MG250485). Todos pertencem à

família Autographiviridae, apresentam molécula de DNA dupla-fita linear e infectam os seguintes hospedeiros: *Pseudomonas fluorescens* (WRT, KNP Pfl e ERZ 2017), *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (ΦPSA2, PPPL-1, ΦPsa17, 17A, sh12, Henninger) e *Pseudomonas putida* (gh-1).

Com relação às ORF, foram identificadas 13 ORFs relacionadas a proteínas estruturais (montagem da partícula viral) e 11 ORF não estruturais (associados ao metabolismo do DNA, incluindo a proteína de ligação ao DNA, DNA primase, DNA helicase e DNA ligase, além das enzimas polimerases, exonuclease, lisozima). Entre esses genes, o fago PCMW57 apresenta um gene que codifica RNA polimerase (ORF 10), similar à do fago ΦPsa17. Ou seja, o fago codifica sua própria maquinaria transcricional para replicação viral, o que o caracteriza como um fago da subfamília Autographiviridae (“Auto” e “graphein” derivam do grego, significando “auto-escrita” ou “auto-transcrição”). Trata-se de fagos que codificam sua própria RNA polimerase de subunidade única, que tem função de catalisar a transcrição de genes virais, sendo esta uma característica comum e definidora entre seus membros (Adriaenssens *et al.*, 2020). Além disso, as características morfológicas definidoras de todos os vírus da subfamília Autographiviridae é que eles possuem uma pequena cabeça isométrica (aproximadamente 60 nm de diâmetro) presa a uma cauda curta (Adriaenssens *et al.*, 2020). A subfamília Autographiviridae pertence à família Podoviridae,

Ainda, encontrou-se no sequenciamento que 51% das ORFs relacionadas ao fago possuem função indefinida (hipotéticos). Mais de 50% dos produtos do gene do fago previstos *in silico* são hipotéticos e não têm uma função atribuída devido à falta de dados experimentais (Klumpp *et al.*, 2013). Entretanto, muitas das proteínas hipotéticas de fagos estão provavelmente envolvidas no reconhecimento do hospedeiro e na interrupção do metabolismo do hospedeiro (Klumpp *et al.*, 2013).

Em Caudovirales, a especificidade de um fago pelo hospedeiro é determinada, em parte, como já citado anteriormente, por genes que codificam proteínas da cauda. No caso do fago PCMW57, há quatro genes que codificam proteínas relacionadas à cauda: proteína de montagem de cauda (ORF 33), proteína A tubular de fibra da cauda (ORF 37), proteína B tubular de fibra da cauda (ORF 37) e proteína da fibra da cauda (ORF 43). Outros genes relacionados à infecção são aqueles que codificam enzimas líticas, tais como holina (ORF 45), lisozima (ORF 21) e Rz (ORF 47). Holinas são proteínas de membrana que, em um momento geneticamente programado do ciclo infeccioso de bacteriófago, permitem que enzimas bacteriolíticas, ou endolisinas, acionam o processo de lise e ataquem a parede celular (Barenboim *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 2012). São, portanto, as enzimas responsáveis por “disparar” o processo, ou seja, a lise é efetuada pela ação da endolisina e controlada pela holina (Young, 2014). Por sua vez, a lisozima é uma enzima que provoca a lise da célula bacteriana e liberação dos bacteriófagos (Maurice *et al.*, 2013) através da degradação de peptidoglicano, componente estrutural da superfície bacteriana e tem um papel fulcral para a viabilidade da bactéria (Jameson *et al.*, 2020). Por fim, para a maioria dos fagos de hospedeiros Gram-negativos (como é o caso do fago PCMW57), tanto o peptidoglicano quanto a membrana externa devem ser ativamente interrompidos para atingir a lise, que é obtido por uma terceira classe funcional de proteínas de lise, codificadas pelo gene Rz. Estas proteínas têm função no processo biológico de citólise e liberação viral da célula hospedeira, ou seja, a etapa final no ciclo de infecção do fago, sendo responsáveis pela ruptura da membrana externa da bactéria (Berry *et al.*, 2008; Young, 2012).

Os resultados deste estudo mostraram que, na presença de fago, sob diferentes MOI, o crescimento de bactérias foi inibido. O MOI com melhor desempenho foi o MOI 1, uma vez que inibiu completamente o crescimento da bactéria. MOI's de 0,1,

0,01 e 0,001 também apresentaram redução da densidade populacional, mas aparentemente, quanto maior a diluição do fago, menor a porcentagem de células infectadas por pelo menos uma partícula viral. Isso pode explicar o resultado do teste de resazurina na Figura 22, em que há células bacterianas viáveis na diluição 10^4 , mas não o suficiente para ter um crescimento significativo que apareça na Figura 21.

Este trabalho explorou, de modo inovador, o uso da resazurina no método de microdiluição em caldo para a determinação da atividade antibacteriana do fago. O método, que usa o indicador colorimétrico de oxidação-redução resazurina, foi proposto para a determinação da resistência a drogas e concentrações inibitórias mínimas de agentes antimicrobianos contra organismos patogênicos (Ncube *et al.*, 2008). Trata-se de um método sensível, simples, rápido e confiável (Sarker *et al.*, 2007). Em seu estado oxidado, a resazurina é azul e torna-se rosa quando reduzida pelas células viáveis, tornando-se mais clara conforme o oxigênio se torna limitante no meio (Guerin *et al.*, 2001). Deste modo, pode ser facilmente detectado a olho nu, mesmo sem o auxílio de um espectrofotômetro. O ensaio de resazurina pode ser, portanto, uma etapa alternativa e complementar à técnica de plaqueamento, por ser rápido e permitir tanto a leitura em espectrofotômetro quanto a observação visual.

A busca por melhores alternativas contra microrganismos fitopatogênicos resistentes aos tratamentos convencionais é de grande importância. O controle químico com compostos de cobre ou antibióticos é problemático devido aos custos de pulverização e à variabilidade na eficácia (Osdaghi, 2020). Dentre os patovares do complexo *P. syringae*, há diversos relatos na literatura de bactérias resistentes à produtos à base de cobre – os mesmos produtos utilizados para o controle de *P. cichorii*. Alexander *et al.* (1999) fez o primeiro relato de *P. syringae* pv. *tomate* resistente à produtos à base de cobre. Em 1995, Spotts & Cervantes já haviam relatado *P. syringae*

P. syringae resistentes ao cobre, bem como Cazorla *et al.* (2002), que comprovaram a presença de um plasmídeo que conferiu resistência de *P. syringae* pv. *syringae* ao sulfato cúprico. Plasmídeos que tornam bactérias do complexo *P. syringae* resistentes tanto ao cobre quanto à estreptomicina já haviam sido descritos por Trevors em (1987) e posteriormente por Sundin & Bender em 1993 e em 1996.

No caso de fitobactérias resistentes à antibióticos, Spotts & Cervantes (1995) detectaram isolados de *P. syringae* pv. *syringae* resistentes a oxitetraciclina e estreptomicina no Oregon, EUA. Silva & Lopes (1995a) relataram *P. syringae* pv. *tomato* em lavouras de tomate para processamento industrial no Brasil resistentes a estreptomicina e oxitetraciclina. A resistência à estreptomicina e a tolerância ao cobre foram relatadas entre as cepas de *P. cichorii* em canteiros de aipo (Pohronezny *et al.*, 1994).

Na utilização de antibióticos para controle de doenças causadas por bactérias deve-se ponderar o custo, registro para a cultura, período de carência e a interferência no ecossistema envolvido (Mello *et al.*, 2011). A utilização repetida e frequente do mesmo antibiótico leva ao surgimento de bactérias resistentes aos princípios ativos, o que tem acontecido em doenças bacterianas para diversos patógenos de vegetais (Beriam, 2007). O que se espera com o uso dos fagos é que não se cometam os mesmos erros cometidos com os antibióticos: não somente evitar o seu uso excessivo, mas também que se faça o desenvolvimento e monitoramento da remoção adequada de fagos após sua aplicação bem-sucedida. Isso porque não se quer propagação descontrolada de fagos, nem o desenvolvimento de bactérias resistentes a eles (Sommer *et al.*, 2019). Contudo, os fagos apresentam potencial reduzido para induzir resistência, devido a gama de hospedeiros relativamente reduzida exibida pela maioria dos fagos, o que limita o número de tipos de bactérias com os quais a seleção para mecanismos

específicos de resistência a fagos pode ocorrer (Loc-Carrillo & Abedon, 2011). Por fim, neste contexto, deve-se considerar-se que as mutações fágicas são perfeitamente capazes de acompanhar as alterações bacterianas (Levin & Bull, 2004).

No Brasil, *P. cichorii* afeta vários vegetais folhosos, como cenoura, alho, quiabo e outros (Beriam, 2007). No entanto, é considerada uma bactéria cosmopolita e a água de irrigação é suspeita como sendo a fonte de inóculo mais provável para surtos de podridão da nervura central no ambiente protegido da estufa (Cottyn *et al.*, 2011). Estudos têm demonstrado que o controle de *P. cichorii* com compostos químicos e antibióticos é problemático, devido ao custo e eficácia, além do desenvolvimento de resistência bacteriana (Pohronezny *et al.*, 1994; Osdaghi, 2020). Assim, a medida mais importante para o controle da doença causada por *P. cichorii* é a prevenção da contaminação cultural. Mesmo uma baixa concentração de inóculo de *P. cichorii* é capaz de desenvolver sintomas em algumas culturas. Pauwelyn *et al.* (2011) relataram que uma única irrigação aérea com água contendo 10^2 UFC/ml de *P. cichorii* foi suficiente para causar podridão central em alface. Rajendran *et al.* (2016) observaram necrose de folhas de bordas de tomateiros com $\leq 10^4$ UFC/ml de inoculação por imersão com *P. cichorii*.

Além da vantagem de serem altamente específicos ao hospedeiro, os fagos não infectam humanos e outros eucariotos, não alteram a qualidade dos alimentos porque eles não produzem quaisquer substâncias que podem alterar o sabor, composição, aroma ou cor dos alimentos, e é relativamente fácil de isolar fagos do ambiente e propagá-los em laboratórios (Lu, Breit, 2005). A existência e a especificidade do bacteriófago por *P. cichorii* é muito promissora para o controle biológico deste fitopatógeno.

Os fagos são utilizados como terapia de controle bacteriano há pelo menos 100 anos, mas seu uso ainda é restrito pelos órgãos de fiscalização sanitária em muitos

países. Até o momento, não há produtos de fago disponíveis para uso na agricultura no mercado nacional ou internacional. No Brasil, não existem produtos disponíveis no mercado à base de fagos, enquanto que nos Estados Unidos da América, há diversos produtos aprovados pela FDA para uso na indústria de alimentos. No entanto, não se trata de uma tecnologia nova: um dos estudos mais antigos com uso de bacteriófagos como biocontrole para bactérias que causam doenças em plantas data de 1925 (Coons & Kotila, 1925), ou seja, cerca de uma década após a descoberta dos fagos.

Embora este tenha sido o primeiro trabalho a isolar e caracterizar um fago para biocontrole de *P. cichorii*, diversos estudos têm sido desenvolvidos a fim de conhecer a eficiência de fagos no biocontrole de bactérias pertencentes ao complexo *P. syringae*, grupo ao qual a *P. cichorii* pertence. Neste contexto, buscou-se amplamente na literatura a descrição de bacteriófagos já isolados e caracterizados para uso no controle da fitobactéria *P. cichorii*, a qual pertence ao complexo *P. syringae* (Palleroni, 1984; Yamamoto *et al.*, 2000). Trata-se de um patógeno importante, que causa doenças em uma série de hospedeiros, entre os quais estão plantas de grande importância econômica. Atualmente, há relatos da presença da bactéria em todos os continentes. As perdas nas culturas infectadas por *P. cichorii* podem ser parciais ou totais e seu controle é difícil (CABI, 2020). Não foi encontrado nenhum bacteriófago identificado para este patógeno, sendo o fago PCMW57 o primeiro relatado infectando *P. cichorii*. Deste modo, os resultados obtidos no presente estudo mostraram-se pioneiros e promissores, encorajando os pesquisadores a realizar testes em plantas em breve.

Há diversas maneiras de utilizar os fagos como agentes de biocontrole. Após a análise da atividade antimicrobiana do fago PCMW57 *in vitro* no presente estudo, pretende-se aplicar o fago em plantas de tomate e de alface. Estudos com tomateiros utilizaram os fagos na rizosfera (Bae, 2012; Fujiwara *et al.*, 2011), que é a região do

solo onde as raízes das plantas se desenvolvem, pouco abaixo da superfície (Chequer *et al.*, 2010). Também há estudos que utilizam pulverização de fagos, tanto em tomateiro (Balogh *et al.*, 2003) quanto em alface (Lim *et al.*, 2013). Tanto em folhas de alface quanto em folhas de tomate, uma baixa concentração bacteriana (10^2 - 10^4 UFC/ml, respectivamente) é capaz de desenvolver sintomas nestas culturas, se as condições forem de alta umidade e temperatura (Pauwelyn *et al.*; 2011; Rajendran *et al.*; 2016). Para o estudo em plantas, pretende-se inocular a bactéria por borrifamento em ambiente controlado (alta umidade e temperatura de cerca de 26 °C), bem como pulverização do fago para o biocontrole. Alta umidade e temperatura de 26 °C. não afetam a sobrevivência dos fagos, conforme mostrado no presente estudo *in vitro*.

Dentre as dificuldades encontradas no presente estudo, pode-se citar a adequação do protocolo de isolamento do fago e posteriores testes como, por exemplo, o uso de clorofórmio para isolamento e preservação dos fagos. Além disso, o fago mostrou-se bastante sensível ao uso do vortex ou ao uso de pipetagem mais vigorosa, o que também resultava na perda dos fagos.

6. CONCLUSÕES

No presente estudo, foi isolado, caracterizado e avaliado o efeito de um bacteriófago para a fitobactéria *Pseudomonas cichorii*. O bacteriófago, denominado PCMW57, de ciclo de vida virulento (lítico), foi isolado de vegetais folhosos (alface, chicória e repolho) que apresentavam sintomas visíveis de doenças bacteriana e mostrou especificidade à bactéria.

Quanto à estabilidade do fago a fatores ambientais como temperatura e pH, o fago mostrou-se resistente até 45 °C e estável em uma faixa de pH de 5,0 a 8,5. Além disso, foi possível armazenar o fago a -20 °C e mantê-lo viável após o descongelamento. O período de tempo latente do fago foi de aproximadamente 60 minutos e o tamanho do *burst* do fago foi de cerca de 151 partículas de fago por célula infectada. Em teste de atividade antimicrobiana *in vitro*, sob diferentes multiplicidades de infecção, o fago mostrou importante habilidade de lisar a bactéria.

O genoma do fago PCMW57 foi caracterizado, tendo 40.117 bp de comprimento e 49 *Open reading frame* (ORF ou Fase de Leitura Aberta). O fago é geneticamente semelhante a outros fagos de *Pseudomonas*, compartilhando homologia acima de 85% com os fagos WRT, ΦPSA2, ΦPsa17, KNP e gh-1, todos pertencentes ao gênero T7-vírus. Diversos estudos fornecem evidências convincentes a respeito da eficácia e segurança do uso de fagos no biocontrole de bactérias fitopatogênicas. Além disso, produtos comerciais à base de fagos já estão disponíveis no mercado de países como Estados Unidos da América e Canadá, para uso no controle de bactérias patogênicas em alimentos, mas nenhum produto disponível para fitobactérias.

Os resultados do presente estudo foram encorajadores. Tem-se como perspectivas futuras deste estudo, testes em plantas sob diferentes situações de controle (plantio, crescimento, colheita e pós-colheita). Entretanto, ficou evidente que o fago

isolado foi eficaz nas condições simuladas, e tem alto potencial para uso como agente de biocontrole de *P. cichorii*, sendo este o primeiro relato de um bacteriófago infectando este patógeno.

7. PERSPECTIVAS

Os próximos passos incluem a realização de mais estudos em diferentes espécies hospedeiras. Protocolos de controle de fitobactérias em plantas são essenciais para validar o potencial *in vitro* do fago PCMW57 aqui isolado. Assim as perspectivas futuras deste trabalho são:

- Realizar a confirmação da classificação dos vírus na família *Podoviridae* utilizando imagens de microscopia eletrônica de transmissão;
- Testar a capacidade lítica do fago isolado em cepas de fitobactérias de grande importância econômica, como *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas campestris* e *Erwinia carotovora*.
- Testar a capacidade lítica do fago isolado em cepas de *Pseudomonas cichorii* isoladas de diferentes locais geográficos e diferentes fontes botânicas;
- Testar a capacidade lítica do fago em cepas de *Pseudomonas cichorii* em plantas (*in vivo*) sob diferentes situações de controle (plantio, crescimento, colheita e pós-colheita);

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abedon, S.T. (2009). Phage evolution and ecology. **Adv. Appl. Microbiol.** 67: 1–45.
- Abedon, S.T. The **Bacteriophages**. Volume 2. Oxford University Press, USA, 2006 - 746 pag.
- Abedon, S.T.; Kuhl, S.J.; Blasdel, B.G.; Kutter, E.Martin. (2011). Phage treatment of human infections. **Bacteriophage**. 1(2): 66–85. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.15845>.
- Abedon, S.T.; Thomas-Abedon, C.; Thomas, A.; Mazure, H. (2011). Bacteriophage prehistory: Is or is not Hankin, 1896, a phage reference? **Bacteriophage**. 1(3): 174-178. <https://doi.org/10.4161/bact.1.3.16591>.
- Ackermann, H.W. (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. **Arch Virol.** 152: 227–243. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0849-1>.
- Ackermann, H.W.; Abedon, S.T. (2000). The Bacteriophage Ecology Group: Bacteriophage names 2000. **Disponível online:** <http://www.phage.org/names/2000/>. (10 de maio de 2020).
- Ackermann, H.W. Tailed bacteriophages: the order *Caudovirales*. (1998). **Adv in Virus Res.** 51: 135-201. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)60785-X](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60785-X).
- Ackermann, H.W.; Tremblay, D.; Moineau, S. (2004) Long-term bacteriophage preservation. **WFCC Newslett.** 38: 35–40.
- Ackermann, H.W.; Węgrzyn, G. (2014). **General Characteristics of Bacteriophages**. In: Borysowski, J.; Międzybrodzki, R.; Górski, A. **Phage Therapy: Current Research and Applications**. Jan Caister Academic Press, U.K.
- Adriaenssens, E.M., Van Vaerenbergh, J., Vandenneuvel, D., Dunon, V., Ceysens, P.-J., De Proft, M.; Kropinski, A.M.; Noben, J.P.; Maes, M.; Lavigne, R. (2012). T4-

related bacteriophage LIMEstone isolates for the control of soft rot on potato caused by *Dickeya solani*. **PLoS ONE** 7:e33227. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033227>.

Adriaenssens, E.M.; Sullivan, M.B.; Knezevic, P. *et al.* (2020). Taxonomy of prokaryotic viruses: 2018-2019 update from the ICTV Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee. **Arch Virol.** 165: 1253–1260. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04577-8>.

Alexander, S.A.; Kim, S.H.; Waldenmaier, C.M. (1999). First report of copper-tolerant *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in Virginia. **Plant Dis.** 83: 964–964. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.10.964C>.

Alippi, A.M.; Lopéz, A.C.; Rollan, M. C.; Ronco, L.; Aguilar, O. M. (2002). Fluorescent *Pseudomonas* species causing post-harvest decay of endives in Argentina. **Revista Argentina de microbiologia.** 34(4): 193–198.

Amarillas, L.; Estrada-Acosta, M.; León-Chan, R.G; López-Orona, C.; Lightbourn, L. (2020). Complete genome sequence of Phobos: a novel bacteriophage with unusual genomic features that infects *Pseudomonas syringae*. **Arch Virol.** 165(6): 1485-1488.

Anjos, T.V.; Tebaldi, N.D.; Fagiani, C.C. (2012). Coleção e preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas. Seção Ciências Agrárias. **Rev Horizonte Científico.** 6(1): 1-24.

Anzai, Y.; Kim, H.; Park, J.Y.; Wakabayashi, H.; Oyaizu, H. (2000). Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** 50: 1563–1589.

Aysan, Y.; Mirik, M.; & Sahin, F. (2009). First Report of Bacterial Leaf Spot Caused by *Pseudomonas cichorii* on *Schefflera arboricola* in Turkey. **Plant disease.** 93(8): 848. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-8-0848B>.

- Azeredo, J.; Sillankorva, S.; Pires, D.P. (2014) **Pseudomonas Bacteriophage Isolation and Production**. In: Filloux A., Ramos JL. (eds) **Pseudomonas Methods and Protocols**. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 1149. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_4.
- Bae, J.Y.; Wu, J.; Lee, H.J.; Jo, E.J.; Murugaiyan, S.; Chung, E.; Lee, S.W. (2012). Biocontrol potential of a lytic bacteriophage PE204 against bacterial wilt of tomato. **J. Microbiol. Biotechnol.** 22: 1613–1620. <https://doi.org/10.4014/jmb.1208.08072>.
- Bao, H.; Zhang, H.; Wang, R. (2011). Isolation and characterization of bacteriophages of *Salmonella enterica* serovar Pullorum. **Poult Sci.** 90(10): 2370-2377. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01496>.
- Balogh, B.; Jones, J.B.; Momol, M.T.; Olson, S.M.; Obradovic, A.; King, P.; Jackson, L.E. (2003). Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato plant disease. **Plant Disease.** 87(8): 949-954. <https://doi.org/10.1094/pdis.2003.87.8.949>.
- Bao, H.; Zhang, H.; Wang, R. (2011). Isolation and characterization of bacteriophages of *Salmonella enterica* serovar Pullorum. **Poult Sci.** 90(10): 2370-2377. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01496>.
- Barenboim, M.; Chang, C.Y.; dib Hajj, F.; Young, R. (1999). Characterization of the dual start motif of a class II holin gene. **Mol Microbiol.** 32(4): 715-727. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01385.x>.
- Bazzi, C.; Mazzucchi, U. (1979). An epidemic of *Pseudomonas cichorii* on lettuce. **Informatore Fitopatologico.** 29(9) :3-6.
- Beriam, L.O.S. (2007) Palestra: Doenças bacterianas em hortaliças. **Biológico.** 69(2): 81-84.

- Beriam, L.O.S.; Almeida, I.M.G.; Malavolta Júnior, V.A. (2001). Crestamento bacteriano em calêndula. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. 7(2): 149-152.
- Beriam, L.O.S.; Almeida, I.M.G.; Patrício, F.R.A. (2011). **Impacto potencial das mudanças climáticas sobre as doenças bacterianas no Brasil**. Capítulo 4. In: Ghini, Raquel; Hamada, Emília; Bettiol, Wagner. **Impactos das mudanças climáticas sobre doenças de importantes culturas no Brasil**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 356 p.
- Beriam, L.O.S.; Almeida, I.M.G.; Rodrigues Neto, J.; Malavolta Junior, V.A. (1998). Peruvian carrot, a new host of *Pseudomonas cichorii*. (Mandioquinha-salsa, novo hospedeiro de *Pseudomonas cichorii*). **Summa Phytopathologica**. 24 (3/4), 261-262.
- Berry, J.; Summer, E.J.; Struck, D.K.; Young, R. (2008). The final step in the phage infection cycle: the Rz and Rz1 lysis proteins link the inner and outer membranes. **Molecular microbiology**. 70(2): 341–351. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06408.x>.
- Brown, T. (2008). **Genomas/ Genome**. Editora Médica Panamericana. 738 pág.
- Brussow, H.; Hendrix, R.W. (2002). Phage Genomics: Small Is Beautiful Minireview. **Cell**. 108: 13–16. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00637-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00637-7).
- CABI. Centre of Agriculture and Biosciences International. Invasive Species Compendium. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/>. Visualizado em 15/09/2020.
- Cambra, M.A.; Palacio-Bielsa, A.; López, M.M. (2004). Borage (*Borago officinalis*) is a new host of *Pseudomonas cichorii* in the Ebro Valley of Spain. **Plant disease**. 88(7): 769. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.7.769A>.

Capra, M.L.; Quiberoni, A.; Reinheimer, J.A. (2004). Thermal and chemical resistance of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* bacteriophages. **Letters in Applied Microbiology**. 38: 499–504. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01525.x>.

Cazorla, F.M.; Arrebola, E.; Sesma, A.; Pérez-García, A.; Codina, J.C.; Murillo, J.; De Vicente, A. (2002). Copper Resistance in *Pseudomonas syringae* strains isolated from mango is encoded mainly by plasmids. **Phytopathology**. 92(8): 909-916. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.8.909>.

Center for Phage Technology. Protocol for Phage DNA Extraction with Phenol:Chloroform. **Disponível (online)** <https://cpt.tamu.edu/wordpress/wp-content/uploads/2018/09/Phage-DNA-Extraction-by-PhenolChloroform-Protocol.pdf> (03/10/2019).

Chain, E.; Florey, H.W.; Gardner, A.; D.; Heatley, N.G.; Jennings, M.A.; Orr-Ewing, J.; Sanders, A.G.; Peltier, L.F. (2005). The classic: penicillin as a chemotherapeutic agent. **Clinical orthopaedics and related research**. 439: 23-26. <https://doi.org/10.1097/01.blo.0000183429.83168.07>.

Chain, E.; Florey, H.W.; Gardner, A.D.; Heatley, N.G.; Jennings, M.A.; Orr-Ewing, J.; Sanders, A.G. (1940). Penicillin as a chemotherapeutic agent. **The Lancet**. 236 (6104): 226-228. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)08728-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)08728-1).

Chase, A.R. (1986). Comparison of three bacterial leaf spots of *Hibiscus rosa-sinensis*. **Plant Disease**. 70 (4): 334-336. <https://doi.org/10.1094/PD-70-334>.

Chase, A.R. (1987). Leaf and petiole rot of *Ficus lyrata* cv. *compacta* caused by *Pseudomonas cichorii*. **Plant Pathology**. 36(2): 219-221.

Chaturongakul, S.; Ounjai, P. (2014). Phage-host interplay: examples from tailed phages and Gram-negative bacterial pathogens. **Front Microbiol.** 5 (442): 1-6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00442>.

Cheil Jedang Research Institute of Biotechnology. (2020). Disponível online <https://m.cj.co.kr/en/about/cj-cheiljedang/overview>. (13 de setembro).

Chen, Y; Sun, E; Song, J; Yang, L; Wu, B. (2018). Complete genome sequence of a novel t7-like bacteriophage from a *Pasteurella multocida* capsular type A isolate. **Current Microbiology.** 75: 574–579. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1419-3>.

Chequer, L.; Crapez, M.; Da Silva, F.; Fontana, L. (2010). Efeito rizosfera: simbiose entre raízes de plantas e bactérias. **Ciência Hoje** 46(273): 40-45.

Chopra, I.; Hodgson, J.; Metcalf, B.; Poste, G. (1997). The search for antimicrobial agents effective against bacteria resistant to multiple antibiotics. **Antimicrobial agents and chemotherapy.** 41(3): 497–503. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.3.497>.

Clark W.A., Geary D. (1973). Preservation of Bacteriophages by Freezing and Freeze-Drying. **Cryobiology.** 10: 351-360.

Clokic, M.; Kropinski, A. (2009) Bacteriophages: Methods and Protocols: Isolation, Characterization, and Interactions (Methods in Molecular Biology. **Humana Pr Inc.** 1: 69–76.

Coil, D.; Jospin, G.; Darling, A.E. (2015). A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data, **Bioinformatics.** 31(4): 587–589, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu661>.

Colariccio, A.; Chaves, A.L.R. (2017). **Boletim Técnico Aspectos Fitossanitários da Cultura da Alface.** Instituto Biológico. Número 29. São Paulo: Instituto Biológico. 126 p.

Coleno, A.; Ie Normand, M.; Hingand, L. Sur une affection bacterienne de la pomme de Chou-Fleur. (1971). *Compte rendu hebdomadaire des seances de l'Academie d'agriculture de France* 57(8): 650-652.

Coons, G.; Kotila, J. (1925). The transmissible lytic principle (bacteriophage) in relation to plant pathogens. **Phytopathology**. 15: 357–370.

Cottyn, B.; Baeyen, S.; Pauwelyn, E.; Verbaendert, I.; De Vos, P.; Bleyaert, P.; Höfte, M.; Maes, M. (2011). Development of a real-time PCR assay for *Pseudomonas cichorii*, the causal agent of midrib rot in greenhouse-grown lettuce, and its detection in irrigating water. **Plant Pathology**. 60: 453-461. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02388.x>.

Cottyn, B.; Heylen, K.; Heyrman, J.; Vanhouteghem, K.; Pauwelyn, E.; Bleyaert, P.; Vaerenbergh, J.; van Höfte, M.; de Vos, P.; Maes, M. (2009). *Pseudomonas cichorii* as the causal agent of midrib rot, an emerging disease of greenhouse-grown butterhead lettuce in Flanders. **Systematic and Applied Microbiology**. 32 (3): 211-225. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.11.006>.

Czajkowski, R.; Ozymko, Z.; de Jager, V.; Siwinska, J.; Smolarska, A.; Ossowicki, A.; Narajczyk, M.; Lojkowska, Ewa. (2015). 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** 10:e0119812. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119812>.

Czajkowski, R.; Ozymko, Z.; Lojkowska, E. (2014). Isolation and characterization of novel soilborne lytic bacteriophages infecting *Dickeya* spp. biovar 3 (*D. solani*). **Plant Pathol.** 63: 758–772. <https://doi.org/10.1111/ppa.12157>.

- D'hondt L. Flow cytometry in plant pathology: a case study on *Pseudomonas cichorii*. [Ghent, Belgium]: Ghent University. Faculty of Bioscience Engineering; 2011. <http://hdl.handle.net/1854/LU-1929303>.
- Delbrück, M. (1940). The growth of bacteriophage and lysis of the host. **The Journal of general physiology**. 23(5): 643–660. <https://doi.org/10.1085/jgp.23.5.643>.
- Dixon B. New dawn for phage therapy. (2004) **Lancet Infect Dis**. 4(3): 186. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)00951-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)00951-X).
- Elbreki, M.; Ross, P.; Hill, C.; O'Mahony, J.; McAuliffe, O.; Coffey, A. CC BY 3.0. Creative Commons (CC) File: The three-tailed phage families.jpg. **Disponível (online)** <https://search.creativecommons.org/photos/3346657c-ff27-4339-8215-12fad0797d1e>.
- Ellis, E.L.; Delbrück., M. (1939). The growth of bacteriophage. **J Gen Physiol** 22(3): 365–384. <https://doi.org/10.1085/jgp.22.3.365>.
- Engelhard, A.W.; Mellinger, H.C.; Ploetz, R.C.; Miller, J.W. (1983). A leaf spot of florist's geranium incited by *Pseudomonas cichorii*. **Plant Disease**. 67(5): 541-544.
- Ferreira-Pinto, M.M.; Oliveira, H. (1993). A new bacterial disease of lettuce in Portugal caused by *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp. **Phytopathologia Mediterranea**, 32(3): 249-253. <https://www.jstor.org/stable/42685905>.
- Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **Br J Exp Pathol**. 10(3): 226-236.
- Flugge, C. (1886). Die Mikroorganismen, 2^a. ed. Leipzig: F. C. W. Vogel. **Disponível online** <https://www.biodiversitylibrary.org/item/181583#page/11/mode/1up>. (09 junho 2020).
- Frampton, R.A.; Acedo, E.L.; Young, V.L.; Chen, D.; Tong, B.; Taylor, C.; Easingwood, R.A.; Pitman, A.R.; Kleffmann, T.; Bostina, M.; Fineran, P.C. (2015).

Genome, proteome and structure of a T7-like bacteriophage of the kiwifruit canker phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. **Viruses**. 7: 3361-3379. <https://doi.org/10.3390/v7072776>.

Hojo, H.; Koyanagi, M.; Tanaka, M.; Kajihara, S.; Ohnishi, K.; Kiba, A.; Hikichi, Y. (2008). The hrp genes of *Pseudomonas cichorii* are essential for pathogenicity on eggplant but not on lettuce. **Microbiology**. 154(10): 2920–2928. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/021097-0>.

Frampton, R.A.; Taylor, C.; Holguín Moreno, A.V.; Visnovsky, S.B.; Petty, N.K.; Pitman, A.R.; Fineran, P.C. (2014). Identification of bacteriophages for biocontrol of the kiwifruit canker phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. **Applied and environmental microbiology**. 80(7): 2216–2228. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-14>.

Freire, J.R.J. (1954). Uma bacteriose em alface (*Lactuca sativa* L.) causada por *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp. **Rev Agron** 17: 36-40. 1954.

Fu, X.Y.; Zhang, R.Y.; Tan, Z.Q.; Liu, T.; Peng, Z.Q. (2019). First report of bacterial leaf spot of cucumber caused by *Pseudomonas cichorii* in China. **Plant Disease**. 103(1): 147-148. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-18-0267-PDN>.

Fujiwara, A.; Fujisawa, M.; Hamasaki, R.; Kawasaki, T.; Fujie, M.; Yamada, T. (2011). Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages. **Applied and environmental microbiology**. 77(12): 4155–4162. <https://doi.org/10.1128/AEM.02847-10>.

Gadd, G.M.; Sariaslani, S. (2018). **Advances in Applied Microbiology**. Vol. 103. Editora Academic Press. 254 pág.

Garibaldi, A.; Bertetti, D.; Scortichini, M.; Gullino, M. L. (2005). First report of bacterial leaf spot caused by *Pseudomonas cichorii* on *Phlox paniculata* in Italy.

Plant disease. 89(8): 912. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0912C>.

Garibaldi, A.; Gilardi, G.; Moretti, C.; Gullino, M.L. (2009). First report of leaf spot caused by *Pseudomonas cichorii* on *Coreopsis lanceolata* in Italy. **Plant Dis.** 93(9): 967. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-9-0967A>.

Guerin, T.F.; Mondido, M.; McClenn, B.; Peasley, B. (2001). Application of resazurin for estimating abundance of contaminant-degrading micro-organisms. **Letters in Applied Microbiology.** 32: 340-345. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00916.x>.

Guttman, B.; Raya, R.; Kutter, E. (2004). Basic **Phage Biology**. In: Kutter, Elizabeth; Sulakvelidze, Alexander. **Bacteriophages: biology and applications**. CRC Press. Editor Taylor & Francis.

Ha, A.D.; Denver, D.R. (2018). Comparative genomic analysis of 130 bacteriophages infecting bacteria in the genus *Pseudomonas*. **Frontiers in microbiology.** 9: 1456. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01456>.

Haq, I.U.; Chaudhry, W.N.; Andleeb, S.; Qadri, I. (2012). Isolation and Partial Characterization of a Virulent Bacteriophage IHQ1 Specific for *Aeromonas punctata* from Stream Water. **Microb Ecol.** 63: 954–963. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9944-2>.

Hikichi, Y.; Wali, U.M.; Ohnishi, K.; Kiba, A. (2013). Mechanism of disease development caused by a multihost plant bacterium, *Pseudomonas cichorii*, and its virulence diversity. **J Gen Plant Pathol.** 79: 379–389. <https://doi.org/10.1007/s10327-013-0461-7>.

Holguín-Moreno, A.V.; Vives-Flores, M.J.; Jimenez-Sanchez, A.P. (2017). **Composition comprising bacteriophages for reducing, eliminating and/or preventing *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium* and *Salmonella Paratyphi b*** (original in Spanish as Composición que comprende bacteriófagos para reducir, eliminar y/o prevenir *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium* y *Salmonella Paratyphi b*). Universidad de los Andes, assignee. Colombian Pat. No. 15281747.

Huang, C.J; Pauwelyn, E.; Ongena, M.; Debois, D.; Leclère, V.; Jacques, P.; Bleyaert, P.; Höfte, M. (2015). Characterization of cichopeptins, new phytotoxic cyclic lipodepsipeptides produced by *Pseudomonas cichorii* SF1-54 and their role in bacterial midrib rot disease of lettuce. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. 28(9): 1009-1022. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-15-0061-R>.

Huang, X.; Madan, A. (1999). CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. **Genome Res**. 9: 868-877. <https://doi.org/10.1101/gr.9.9.868>.

Hyman, P. (2019). Phages for phage therapy: isolation, characterization, and host range breadth. **Pharmaceuticals**. 12(35): 1-23. <https://doi.org/10.3390/ph12010035>.

Inoue, T.; Kajihara H.; Muramoto, K.; Yoshioka, R.; Sawada H. (2013). Fruit rot, a new symptom of okra bacterial leaf blight, caused by *Pseudomonas cichorii*. **Japanese Journal of Phytopathology**. 79(2): 99-104. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.79.99>.

Integrated Taxonomic Information System (IT IS). ITS Report: *Pseudomonas cichorii* (Swingle, 1925) Stapp, 1928. Taxonomic Serial No.: 965283. **Disponível online** https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=965283#null (10 de novembro de 2020).

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). (2020). **Disponível online** <https://talk.ictvonline.org/>. (11 de setembro de 2020).

Intralytix. Safety by Nature. (2020). **Disponível online** <http://www.intralytix.com/index.php?page=prod>. (29 de maio de 2020).

Jameson, J.L.; Fauci, A.S.; Kasper, D.L.; Hauser, S.L.; Longo, D.L.; Loscalzo, J. **Medicina Interna de Harrison**. 20ª edição. Porto Alegre: Editora AMGH. 4040 pág.

Janse, J. (2008). Biology of *Pseudomonas cichorii* in chrysanthemum. **EPPO Bulletin**. 17(3): 321-333. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1987.tb00045.x>.

Jepson, C.D.; March, J.B. (2004) Bacteriophage lambda is highly stable DNA vaccine delivery vehicle. **Vaccine**. 22:3413–1419.

Jończyk, E.; Kłak, M.; Międzybrodzki, R.; Górski, A. (2011). The influence of external factors on bacteriophages-review. **Folia Microbiologica**. 56(3): 191-200. <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0039-8>.

Jones, J.B.; Engelhard, A.W.; Raju, B.C. (1983). Outbreak of a stem necrosis on chrysanthemum incited by *Pseudomonas cichorii* in Florida. **Plant Disease**. 67(4): 431-433.

Jones, J.B.; Randhawa, P.S.; Sasser, M. (1990). Selective isolation of *Pseudomonas cichorii* from soil and from leaves and buds of *Dendranthema grandiflora*. **Plant Disease**. 74(4): 300-303.

Jurczak-Kurek, A.; Gasior, T.; Nejman-Faleńczyk, B.; Bloch, S.; Dydecka, A.; Topka, G.; Necel, A.; Jakubowska-Deredas, M.; Narajczyk, M.; Richert, M.; Mieszkowska, A.; Wróbel, B.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, A. (2016). Biodiversity of bacteriophages: Morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. **Scientific Reports**. 6: 34338. <https://doi.org/10.1038/srep34338>.

- Kazi, M.; Uday, S.A. (2016). Bacteriophage biocontrol of foodborne pathogens. **Journal of food science and technology**. 53(3): 1355-1362. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1996-8>.
- Kiba, A.; Sangawa, Y.; Ohnishi, K.; Yao, N.; Park, P.; Nakayashiki, H.; Tosa, Y.; Mayama, S.; Hikichi, Y. (2006). Induction of apoptotic cell death leads to the development of bacterial rot caused by *Pseudomonas cichorii*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. 19(2): 112–122. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-19-0112>.
- Kimari, H.; Amorim, L.; Filho, A. B.; Camargo, L.E.A; Rezende, J.A.M (ed.). (1997) **Manual de Fitopatologia**. Vol. 2. Doenças das Plantas Cultivadas. 3ª edição. São Paulo: Agronômica Ceres.
- Kimura, O; Ribeiro, R.L.D. (1994). Taxonomia do gênero *Pseudomonas*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. 2: 209-228.
- Klug, W.S.; Cummings, M.R.; Spencer, C.A.; Palladino, M.A. (2010) **Conceitos de Genética**. Porto Alegre: Editora Artmed.
- Klumpp, J.; Fouts, D.E.; Sozhamannan, S. (2013). Bacteriophage functional genomics and its role in bacterial pathogen detection. **Briefings in Functional Genomics**. 12(4): 354–365. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elt009>.
- Knipe, D.M.; Howley, P.M. (2007). **Fields' Virology**, Volume 1. 5ª. edição. Filadélfia: Editora Lippincott Williams & Wilkins. 3177 pág.
- Kropinski, A.M.; Mazzocco, A.; Waddell, T.E.; Lingohr, E.; Johnson, R.P. (2009) **Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay**. In: Clokie, M.R.; Kropinski, A.M. (eds) **Bacteriophages. Methods in Molecular Biology**TM. 501. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_7.

- Kutter, E. (2009). **Phage Host Range and Efficiency of Plating**. In: Clokie, M.R.; Kropinski, A.M. (eds) **Bacteriophages. Methods in Molecular Biology™**. 501. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_14.
- Lallo, G.; Evangelisti, M.; Mancuso, F.; Ferrante, P.; Marcelletti, S.; Tinari, A.; Superti, F.; Migliore, L.; D'Addabbo, P.; Frezza, D.; Scortichini, M.; Thaller, M. (2014). Isolation and partial characterization of bacteriophages infecting *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, causal agent of kiwifruit bacterial canker. **J. Basic Microbiol.** 54: 1210-1221. <https://doi.org/10.1002/jobm.201300951>.
- Lee, L.F.; Boezi, J.A. (1966). Characterization of bacteriophage gh-1 for *Pseudomonas putida*. **Journal of Bacteriology.** 92(6): 1821–1827. <https://doi.org/10.1128/JB.92.6.1821-1827.1966>.
- Leite, D.C.; Cunha, A.C.B.; Bizani, D. (2011). Análise de macro e micronutrientes em um estudo comparativo de solo humífero para processos de biorremediação. **Revista de Ciências Ambientais.** 5(2): 93-102.
- Letarov, A.V.; Kulikov, E.E. (2018). Determination of the bacteriophage host range: culture-based approach. **Methods Mol Biol.** 1693: 75-84. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7395-8_7.
- Levin, B., Bull, J. População e dinâmica evolutiva da terapia de fagos. *Nat Rev Microbiol* 2, 166-173 (2004). <https://doi.org/10.1038/nrmicro822>.
- Li, B.J.; Li, H.L.; Shi, Y.X.; Xie, X.W. (2014). First Report of *Pseudomonas cichorii* causing leaf spot of vegetable sponge gourd in china. *plant disease*. **American Phytopathological Society Publications.** 98(1): 153. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-13-0312-PDN>.

- Lim, J.; Jee, S.; Lee, D.; Roh, E.; Jung, K.; Oh, C.; Heu, S. (2013). Biocontrol of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* using bacteriophage PP1. **Journal of microbiology and biotechnology**. 23(8): 1147-53.
- Lima, M.L.P. (2016). Estudos em doenças de plantas – Instituto Federal Goiano Câmpus Urutaí. **Disponível online** <https://fitopatologia1.blogspot.com/2016/07/>. (09 de junho).
- Lin, D.M.; Koskella, B.; Lin, H.C. (2017). Phage therapy: an alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. **World J Gastrointest Pharmacol Ther**. 8(3): 162–173. <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v8.i3.162>.
- Liu, H.; Niu, Y.D.; Meng, R.; Wang, J.; Li, J.; Johnson, R.P.; McAllister, T.A.; Stanford, K. (2015). Control of *Escherichia coli* O157 on beef at 37, 22 and 4 °C by T5, T1-, T4 and O1-like bacteriophages. *Food Microbiol*. 51: 69-73. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.05.001>.
- Lobocka, M.; Hejnowicz, M.S.; Gągała, U.; Weber-Dąbrowska, B.; Węgrzyn, G.; Dadlez, M. (2014). **The first step to bacteriophage therapy - how to choose the correct phage**. In: Borysowski, J.; Międzybrodzki, R.; Górski, A. **Phage therapy: current research and applications**. Caister Academic Press, U.K.
- Loc-Carrillo, C.; Abedon, S.T. (2011) Pros and cons of phage therapy. **Bacteriophage**. 1(2): 111-114. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.14590>.
- Loo, Y.Y.; Rukayadi, Y.; Nor-Khaizura, M.R.; Kuan, C.H.; Chieng, B.W.; Nishibuchi, M.; Radu, S. (2018). In vitro antimicrobial activity of green synthesized silver nanoparticles against selected Gram-negative foodborne pathogen. **Frontiers in Microbiology**. 9(1555): 1-7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01555>.

Lopes, C.A.; Quezado-Duval, A.M.; Reis, A. (2010). **Doenças da alface I**. Brasília: Embrapa Hortaliças. 68 pág.

Lu, Z.; Breidt, F. (2015). *Escherichia coli* O157:H7 bacteriophage Φ241 isolated from an industrial cucumber fermentation at high acidity and salinity. **Frontiers in Microbiology**. 6: 67. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00067>.

Luiz, B.C.; Heller, W.P.; Brill, E.; Bushe, B.C.; Keith, L.M. (2018). First report of bacterial leaf spot caused by *Pseudomonas cichorii* on Thai basil in Hawaii. **Plant Disease**. 102(12): 2637. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-18-0995-PDN>.

Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Bender, K.S.; Buckley, D.H.; Stahl, D.A. (2016). **Microbiologia de Brock**. 14ª edição. Editora Artmed Editora. 1032 pág.

Malavolta Júnior, V.; Almeida, I.M.G.; Rodrigues Neto, J. (2001). Crestamento bacteriano em filodendro causado por *Pseudomonas cichorii*. **Ornamental Horticulture** [S.l.] 7(1): 63-66. <https://doi.org/10.14295/rbho.v7i1.157>.

Mariano, R.L.R.; Reis, A.; Michereff, S.J. (1994). Diseases caused by bacteria on artichoke, lettuce, chicory, strawberry and okra. (Doenças causadas por bactérias em alcachofra, alface, chicória, morango e quiabo.). **Informe Agropecuário**. 17(182): 13-16.

Maringoni, A.C.; Theodoro, G.F.; Ming, L.C.; Cardoso, J.C.; Kurozawa C. (2003). First report of *Pseudomonas cichorii* on turmeric (*Curcuma longa*) in Brazil. **Plant Pathology**. 52(6), 794. <https://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2003.00903.x>.

Mansfield, J.; Genin, S.; Magori, S.; Citovsky, V.; Sriariyanum, M.; Ronald, A.P.; Dow, M.; Verdier, V.; BEER, S.V.; Machado, M.A.; Toth, I.; Salmond, G.; Foster, G.D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**. 13(6): 614–629.

- Marques, E.; Borges, R.C.F.; Uesugi, C.H. (2016). Identification and pathogenicity of *Pseudomonas cichorii* associated with a bacterial blight of gerbera in the Federal District. **Horticultura Brasileira**. 34(2): 244-248. <https://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620160000200015>.
- Maurice, C.F.; Bouvier C.; de Wit, R.; Bouvier, T. (2013). Linking the lytic and lysogenic bacteriophage cycles to environmental conditions, host physiology and their variability in coastal lagoons. **Environ Microbiol**. 15 (9): 2463-75. <https://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.12120>.
- McFadden, L.A. (1961). A bacterial leaf spot of florists' chrysanthemums, *Chrysanthemum morifolium*. **Plant Disease Reporter**. 45: 16-19.
- McKenna, F.; El-Tarabily, K.A.; Hardy, G.E.S.J.; Dell, B. (2001). Novel in vivo use of a polyvalent Streptomyces phage to disinfest Streptomyces scabies-infected seed potatoes. **Plant Pathol**. 50: 666–675. <https://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00648.x>.
- Micreos Food Safety BV. (2020). PhageGuard S. **Disponível online** <https://www.micreos.com/content/contact.aspx>. (15 de setembro)
- Micreos Food Safety BV. (2020). Salmorex™. **Disponível online** <https://www.fda.gov/media/98485/download>. (15 de setembro)
- Middelboe, M. (2000). Bacterial growth rate and marine virus-host dynamics. **Microbial Ecology**. 40: 114–124.
- Middelboe, M.; Chan, A.; Bertelsen, S. (2010). Isolation and life-cycle characterization of lytic viruses infecting heterotrophic bacteria and cyanobacteria. **Manual of Aquatic Viral Ecology**. 13: 118–133. <http://dx.doi.org/10.4319/mave.2010.978-0-9845591-0-7.118>.

Migula W. 1894. Über ein neues System der Bakterien. **Arbeiten aus dem Bakteriologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe**. 1: 235-238.

Miller, J.W.; Knauss, J.F. (1973). Bacterial blight of *Gerbera jamesonii* incited by *Pseudomonas cichorii*. **Plant Disease Reporter**. 57(6): 504-505.

Mirik, M.; Aysan, Y.; Sahin, F. (2011). Characterization of *Pseudomonas cichorii* Isolated from different hosts in Turkey. **International Journal of Agriculture and Biology**. 13(2): 1560-8530.

Melo, M.R.F.; Silveira, E.B.; Viana, I.O.; Guerra, M.L.; Mariano, R.L.R. (2011). Uso de antibióticos e leveduras para controle da podridão-mole em couve-chinesa. **Horticultura Brasileira** 29: 78-83.

Mullan, W.M.A. (2001). Isolation and purification of bacteriophages. **Disponível online** <https://www.dairyscience.info/isolation-and-purification-of-bacteriophages.html>. (23 de setembro de 2020).

National Center for Biotechnology Information (NCBI). Taxonomic Browser: *Pseudomonas cichorii*. **Disponível (online)** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=36746#note1>.

(10 novembro 2020).

Ncube, N. S.; Afolayan, A. J.; Okoh, A. I. (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. **African Journal of Biotechnology**. 7(12): 1797–1806.

Negroni, M. (2018). **Microbiología Estomatológica. Fundamentos y guía práctica**. 3ª. edição. Editora Médica Panamericana.

Newberry, E.A.; Paret, M.L.; Jones, J.B.; Bost, S.C. (2016). First report of leaf spot of pumpkin caused by *Pseudomonas cichorii* in Tennessee. **Plant Disease**. 100(11): 2159-2160. <http://apsjournals.apsnet.org/loi/pdis>.

Nicobdi, M.; Anghinoni, I.; Gianello, C. (2008). Relações entre os tipos e indicadores de acidez do solo em lavouras no sistema plantio direto na região do Planalto do Rio Grande do Sul. **Rev. Bras. Ciênc. Solo** [online]. 32 (3): 1217-1226. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832008000300030>.

Nishiyama, K.; Azegami, K.; Osada, S.; Nakasone, W.; Ezuka, A.; Watanabe, Y. (1986). Bacterial diseases of soybean and their pathogens in Japan. **Bulletin of the National Institute of Agro-Environmental Sciences**. 1:83-94.

Obradovic, A.; Arsenijevic, M. (2002). First report of a wilt and stem rot of muskmelon and watermelon transplant incited by *Pseudomonas cichorii* in Serbia. **Plant Disease**. 86(4): 443. <https://doi.org/10.1094/pdis.2002.86.4.443c>.

Obradovic, A.; Jones, J.B.; Momol, M.T.; Balogh, B.; Olson, S.M. (2004). Management of tomato bacterial spot in the field by foliar applications of bacteriophages and SAR inducers. **Plant Disease**. 88: 736–740. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.7.736>.

Ogiso, H.; Shimuzu, T.; Kawano, T.; Takahashi, Y. (1997). Detection of *Pseudomonas chichorii*, one of the pathogens of lettuce bacterial rot, from lettuce leaves with ELISA procedure. **Proceedings of the Kanto Tosan Plant Protection Society**. 44: 57-61.

Ohata, K.; Serizawa, S.; Shirata, A. (1982). Infection source of the bacterial rot of lettuce caused by *Pseudomonas cichorii*. **Bulletin of the National Institute of Agricultural Sciences**. 36:75-80.

Olson, M.R.; Axler, R.P.; Hicks, R.E. (2004) Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability. **J Virol Meth** 122: 147–152. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.08.010>.

Olson, M.R.; Axler, R.P.; Hicks, R.E. (2004). Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability. **J Virol Meth**. 122: 147–152. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.08.010>.

OmniLytics Incorporated. (2020). BacWash™. **Disponível online** <https://www.omnilytics.com/food-water/>. (15 de setembro).

Osdaghi, E. (2020). CABI Invasive Species Compendium. **Datasheet report for *Pseudomonas cichorii* (bacterial blight of endive)**. Department of Plant Protection, College of Agriculture, Bajgah, Shiraz University, Shiraz, Iran. **Disponível online** <https://www.cabi.org/isc/datasheet/44942>.

Osdaghi, E. (2020). Datasheet report for *Pseudomonas cichorii* (bacterial blight of endive). CABI Invasive Species Compendium. **Disponível online:** <https://www.cabi.org/isc/datasheet/44942> (16 de setembro 2020).

Palleroni, N.J. (1984). **Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894, 237^{AL}**. In Krieg, N.J.; Holt, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 1: 141–199. Baltimore: Williams & Wilkins.

Palleroni, N.J. (2010). The *Pseudomonas* Story. **Environmental Microbiology**. 12(6): 1377–1383.

Parisien, A.; Allain, B.; Zhang, J.; Mandeville, R.; Lan, C.Q. (2008). Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. **Journal of Applied Microbiology**. 104(1): 1-13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03498.x>.

Park, J.; Lim, J.A.; Yu, J.G.; Oh, C.S. (2018), Genomic features and lytic activity of the bacteriophage PPPL-1 effective against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, a cause of bacterial canker in kiwifruit. **J. Microbiol. Biotechnol.** 28(9): 1542–1546. <https://doi.org/10.4014/jmb.1806.06055>.

Patel, N.; Kobayashi, D.Y.; Noto, A.J.; Baldwin, A.C.; Simon, J.E.; Wyenandt, C.A. (2019). First report of *Pseudomonas cichorii* causing bacterial leaf spot on sweet basil (*Ocimum basilicum*) in New Jersey. **Plant Disease.** 103:2666.

Pauwelyn, E.; Vanhouteghem, K.; Cottyn, B.; De Vos, P.; Maes, M.; Bleyaert, P.; Höfte, M. (2011). Epidemiology of *Pseudomonas cichorii*, the cause of lettuce midrib rot. **Journal of Phytopathology.** 159(4): 298 – 305. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01764.x>.

Pernezny, K.; Datnoff, L.; Sommerfeld, M.L. (1994). Brown stem of celery caused by *Pseudomonas cichorii*. **Plant Disease.** 78(9):917-919.

Phagelux Inc. (2020). SalmoPro®. **Disponível online** <https://www.fda.gov/media/95017/download>. (15 de setembro).

Piening, L. J.; MacPherson, D.J. (1985). Stem melanosis, a disease of spring wheat caused by *Pseudomonas cichorii*. **Canadian Journal of Plant Pathology.** 7(2) :168-172.

Pinheiro, L.; Pereira, C.; Frazão, C.; Balcão, V.M.; Almeida, A. (2019). Efficiency of phage $\Phi 6$ for biocontrol of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: an in vitro preliminary study. **Microorganisms.** 7(9): 286. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090286>.

Pinheiro, L.A.M.; Pereira, C.; Barreal, M.E.; Gallego, P.P.; Balcão, V.M.; Almeida, A. (2020). Use of phage $\phi 6$ to inactivate *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit plants: in vitro and ex vivo experiments. **Appl Microbiol Biotechnol.** 104(3): 1319-1330. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10301-7>.

Pinheiro, L.A.M.; Pereira, C.; Frazão, C.; Bacão, V.M.; Almeida, A. (2019). Efficiency of phage $\Phi 6$ for biocontrol of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: an in vitro preliminary study. **Microorganisms**. 7(9): 286. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090286>.

Pires, D. P.; Carvalho, C.; Oliveira, A.; Milho, C.; Akturk, E.; Ribeiro, H.; Silva, M. D.; Monteiro, R. (2017). Bacteriophage isolation, production and purification. Practical Session P1. **3rd. International Hands-on Phage Biotechnology Course**. June 19-23, 2017. Braga, Portugal. P. 1-12.

Pohronezny, K.; Sommerfeld, M.L.; Raid, R.N. (1994). Streptomycin resistance and copper tolerance among strains of *Pseudomonas cichorii* in celery seedbeds. **Plant Disease**. 78(2): 150-153.

Priori, S.E.; Andrews, A.; Nordeen, R.O. (2007). Characterization of bacteriophages of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **Journal of the Arkansas Academy of Science**. 61(14). **Disponível online** <http://scholarworks.uark.edu/jaas/vol61/iss1/14>. (17 de setembro de 2020).

Prokka, T.S. (2014). Rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**. 30(14): 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.

Proteon Pharmaceuticals. (2020). Bafasal[®]. **Disponível online** <https://www.proteonpharma.com/products/bafasal-poultry/>. (13 de setembro).

Pulido, R.P.; Burgos, M.J.G.; Gálvez, A.; López, R.L. (2016). Application of bacteriophages in post-harvest control of human pathogenic and food spoiling bacteria, **Critical Reviews in Biotechnology**. 36(5): 851-861. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1049935>.

Purves, W.K.; Sadava, D.; Orians, G.H.; Heller, H.C. (2005). **Vida: ciência da biologia**. 6^a edição. Porto Alegre: Artmed Editora.

Rabiey, M.; Roy, S.R.; Holtappels, D.; Franceschetti, L.; Quilty, B.J.; Creeth, R.; Sundin, G.W.; Wagemans, J.; Lavigne, R.; Jackson, R.W. (2020). Microbial biotechnology. phage biocontrol to combat *Pseudomonas syringae* pathogens causing disease in cherry. **Microbial Biotechnology**. 13(5): 1428-1445. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13585>.

Rajalingam, N., Lee, Y.H. (2018). Effects of green light on the gene expression and virulence of the plant pathogen *Pseudomonas cichorii* JBC1. **Eur J Plant Pathol**. 150: 223–236. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1270-1>.

Rajalingam, N.; Lee, Y.H. (2015). Green and red light reduces the disease severity by *Pseudomonas cichorii* JBC1 in tomato plants via upregulation of defense-related gene expression. **Phytopathology**. 105(4): 412-418. <https://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-04-14-0108-R>.

Rajendran, D.K.; Park, E.; Nagendran, R.; Hung, N.B.; Cho, B.K.; Kim, K.H.; Lee, Y.H. (2016). Visual analysis for detection and quantification of *Pseudomonas cichorii* disease severity in tomato plants. **Plant Pathol. J.** 32(4): 300-310. <http://dx.doi.org/10.5423/PPJOA.01.2016.0032>.

Reece, J.B.; Wasserman, S.A.; Urry, L.A.; Cain, M.L.; Minorsky, P.V.; Jackson, R.B. (2015). **Biologia de Campbell**. 10ª edição. Porto Alegre: Editora Artmed., 2015. 1488 pág.

Resende, R.R. (2015). **Biotecnologia aplicada à saúde. Fundamentos e Aplicações**. São Paulo, Editora Blucher. 1192 pág.

Rivera, N.; Amat, Z.; Hevesi, M. (1981). *Capsicum* leaf rot caused by *Pseudomonas cichorii* in Cuba. **Agrotecnia de Cuba**. 13(2): 67-72.

Robbs, C.F.; Almeida, A.M.R. (1981). Crestamento bacteriano das folhas do girassol causado por *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp: primeira constatação no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**. 6: 127-130.

Robbs, C.F.; Kimura, O.; Ribeiro, R.L.D.; Oyadomari, L.C. (1974). “Crestamento bacteriano das folhas”: nova enfermidade do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) incitada por *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp. **Arquivos da Universidade Federal Rural**. 4 (2): 1-5.

Rohwer, F. (2003). Global Phage Diversity. **Preview**. 113(2): 141. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00276-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00276-9).

Rombouts, S.; Volckaert, A.; Venneman, S.; Declercq, B.; Vandenneuvel, D.; Allonsius, C.N.; Van Malderghem, C.; Jang, H.B.; Briers, Y.; Noben, J.P.; Klumpp, J.; Van Vaerenbergh, J.; Maes, M.; Lavigne, R. (2016). Characterization of novel bacteriophages for biocontrol of bacterial blight in leek caused by *Pseudomonas syringae* pv. *porri*. **Front. Microbiol.** 7(279): 1-15. <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00279>.

Ruan, H.; Shi, N.; Du, Y.; Chen, F.; Yang, X.; Gan, L.; Dai, Y. (2019). First report of *Pseudomonas cichorii* causing tomato pith necrosis in Fujian Province, China. **Plant Disease**. 103(1): 145. <http://apsjournals.apsnet.org/loi/pdis>. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-18-0959-PDN>.

Ryu, W.S. (2017). **Virus Life Cycle**. Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses. 3: 31–45. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800838-6.00003-5>.

Sarker, S.D.; Nahar, L.; Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in

vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**. 42(4): 321-324.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.01.006>.

Schaad, N.W.; Jones, J.B.; Chun, W. (2001). **Plant pathogen bacterias**. 3^a ed. Saint Paul: APS Press. 373 p.

Semer, C.R.I.V.; Raju, B.C. (1984). Basal rot of geranium cuttings in propagation caused by *Pseudomonas cichorii*. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**. 97: 273-274.

She, X.M.; He, Z.F.; Tang, Y.F.; Lan, G.B. (2016). First report of tomato leaf spot and stem necrosis caused by *Pseudomonas cichorii* in Guangdong Province, China. **Plant Disease**. 100(11): 2319. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0461-PDN>.

Shi, Y.; Yan, Y.; Ji, W.; Du, B.; Meng, X.; Wang, H.; Sun, J. (2012). Characterization and determination of holin protein of Streptococcus suis bacteriophage SMP in heterologous host. **Virology**. 9(70): 1-11. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-70>

Shirata, A.; Ohata, K.; Serizawa, S.; Tsuchiya, Y. (1982). Relationship between the lesion development by *Pseudomonas cichorii* and growth stage and leaf position of lettuce and its infection mechanism. **Bulletin of the National Institute of Agricultural Sciences**. 36: 61-73.

Silva, V.L.; Lopes, C.A. 1995a. Isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* resistentes a estreptomicina e oxitetraciclina em tomateiros pulverizados ou não com antibióticos agrícolas. **Fitopatologia Brasileira**. 20(1): 80-84.

Silva, V.L.; Lopes, C.A. 1995b. Isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* resistentes a cobre em tomateiros pulverizados com fungicidas cúpricos. **Fitopatologia Brasileira**. 20(1): 85-89.

- Sinha, S.; Grewal, R. K.; Roy, S. (2018) **Modeling bacteria-phage interactions and its implications of phage therapy**. Chapter 3. In: Sariaslani, S.; Gadd, G.M. (ed.). **Advances in Applied Microbiology**. 103. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2018.01.005>.
- Šivec, K.; Podgornik, A. (2020). Determination of bacteriophage growth parameters under cultivating conditions. **Appl Microbiol Biotechnol**. 104: 8949–8960. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10866-8>.
- Skerman, V. B. D.; McGowan, V.; Sneath, P. H. A. (1980). Approved list of bacterial names. **Int. J. Syst. Bacteriol**. 30(1): 225–420. doi: <https://doi.org/10.1099/00207713-30-1-225>.
- Słonczewski, J.; Foster, J.W. (2016). **Microbiology: An Evolving Science**. Editora W. W. Norton. 224 p.
- Slopek, S.; Kucharewicz-Krukowska, A.; Weber-Dabrowska, B.; Dabrowski, M. (1985). Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. V. Evaluation of the results obtained in children. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**. 33(2): 241-259.
- Slopek, S.; Weber-Dabrowska, B.; Dabrowski, M.; Kucharewicz-Krukowska, A. (1987). Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981–1986. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**. 35: 569–583.
- Smith, H.W.; Huggins, M.B. (1982). Successful treatment of experimental Escherichia coli infections in mice using phage: Its general superiority over antibiotics. **J Gen Microbiol**. 128: 307–318.

Smith, H.W.; Huggins, M.B. (1983). Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. **J Gen Microbiol.** 129: 2659–2675.

Smith, H.W.; Huggins, M.B.; Shaw, K.M. (1987). The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophages. **J Gen Microbiol.** 133: 1111–1126.

Smith, M.A.; Ramsey, G.B. (1956). Bacterial zonate spot of cabbage. **Phytopathology** 46: 210-213.

Soleimani-Delfan, A.; Etemadifar, Z.; Emtiazi, G.; Bouzari, M. (2015). Isolation of *Dickeya dadantii* strains from potato disease and biocontrol by their bacteriophages. **Brazilian Journal of Microbiology.** 46(3): 791-797. <https://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246320140498>.

Sommer, J.; Trautner, C.; Witte, A.K.; Fister, S.; Schoder, D.; Rossmannith, P.; Mester, P.J. (2019). Don't shut the stable door after the phage has bolted. The importance of bacteriophage inactivation in food environments. **Viruses.** 11(5): 468. <https://doi.org/10.3390/v11050468>.

Sonenshein, A.L. (2006). Bacteriophages: How Bacterial Spores Capture and Protect Phage DNA. **Current Biology: Dispatches.** 16(1): 1416. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.12.007>.

Spiers, A.J.; Buckling, A.; Rainey, P.B. (2000). The causes of *Pseudomonas* diversity. **Microbiol.** 146: 2345-2350.

Spotts, R.A.; Cervantes, L.A. (1995). Copper, oxytetracycline, and streptomycin resistance of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from pear orchards in Oregon and Washington. **Plant Disease.** 79(11): 1132-1135.

Stanier, R.Y.; Palleroni, N.J.; Doudoroff, M. (1966). The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. **J. Gen. Microbiol.** 43(1): 159-271.

Stapp, C. (1935). Eine bakterielle Faule an *Lactuca sativa* var. *capitata* L. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. **Abteilungen**, 291 (11-15): 232-43.

Stefanova, M.; Rodríguez, D.; Pérez, R.; Montero, N. (1992). Identification of *Pseudomonas cichorii* in onion crop (*Allium sativum* L.) in Cuba. **Revista de Protección Vegetal.** 7(1): 5-7.

Strider, D.L.; Jones, R.K. (1977). Bacterial leaf spot and bud blight of chrysanthemum. **North Carolina Flower Growers' Bulletin.** 21: 7-8.

Sugiyama, L.S., Bushe, B.C., Heller, W.P., Keith, L.M. (2018). First report of *Pseudomonas cichorii* causing bacterial leaf blight of *Plumeria pudica* in Hawaii. **Plant Disease.** 102(5): 1025. <http://apsjournals.apsnet.org/loi/pdis>.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-11-17-1771-PDN>.

Sulakvelidze, A. (2011). Safety by nature: potential bacteriophage applications. **Microbe Magazine.** 6: 122-126. <https://doi.org/10.1128/microbe.6.122.1>.

Sulakvelidze, A.; Alavidze, Z.; Morris J.G. Jr. (2001). Bacteriophage Therapy. **Antimicrob Agents Chemother.** 45(3): 649–659.
<https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.649-659.2001>.

Summers, W.C. (2016) Félix Hubert d'Herelle (1873–1949): History of a scientific mind. **Bacteriophage,** 6(4): Article: e1270090.
<https://doi.org/10.1080/21597081.2016.1270090>.

- Sun, F.Z.; Zhu, H.; Li, L.Q.; Zhang, Y.X.; He, L.Y. (1993). Identification of a bacterial pathogen of leaf spot on *Brassica pekinensis* and its host range. **Acta Phytopathologica Sinica**. 23(2), 131-136.
- Sundin, G.W.; Bender, C.L. (1993). Ecological and genetic analysis of copper and streptomycin resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **Appl Environ Microbiol**. 59(4): 1018-24. <https://doi.org/10.1128/AEM.59.4.1018-1024.1993>.
- Sundin, G.W.; Bender, C.L. (1996). Molecular analysis of closely related copper- and streptomycin-resistance plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **Plasmid**. 35(2): 98-107. <https://doi.org/10.1006/plas.1996.0012>.
- Swingle, D.B. (1925). Centre rot of "French Endive" or wilt of chicory (*Cichorium intybus* L.). **Phytopathology**. 15: 730.
- Testen, A.L.; Nahson, J.; Mamiro, D.P.; Miller, S.A. (2015). First report of tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas cichorii* in Tanzania. **Plant Disease**. 99(7): 1035. <http://apsjournals.apsnet.org/loi/pdis>.
- Tey, B.T.; Ooi S.T.; Yong, K.C.; Tan, N.M.Y.; Ling, T.C.; Tan, W.S. (2009). Production of fusion m13 phage bearing the disulphide constrained peptide sequence (C-WSFFSNI-C) that interacts with hepatitis B core antigen. **J African Biotechnol**. 8: 268–273
- Thayer, P.L.; Wehlburg, C. (1965). *Pseudomonas cichorii*, the cause of bacterial blight of celery in the Everglades. **Ibid**. 55: 554-7.
- Thiel K. (2004). Old dogma, new tricks--21st Century phage therapy. **Nat Biotechnol**. 22(1): 31-36. <https://doi.org/10.1038/nbt0104-31>.
- Thomas, R. (1935). A bacteriophage in relation to Stewart's disease of corn. **Phytopathology**. 25: 371–372.

- Timilsina, S.; Adkison, H.; Testen, A.L.; Newberry, E. A.; Miller, S. A.; Paret, M. L.; Minsavage, G. V.; Goss, E. M.; Jones, J. B.; Vallad, G. E. (2017). A novel phylogroup of *Pseudomonas cichorii* identified following an unusual disease outbreak on tomato. **Phytopathology**. 107(11): 1298-1304. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-17-0178-R>.
- Trantas, E.A.; Sarris, P.F.; Mpalantinaki, E.E.; Pentari, M.G.; Ververidis, F.N.; Goumas, D.E. (2013). A new genomovar of *Pseudomonas cichorii*, a causal agent of tomato pith necrosis. **Eur J Plant Pathol**. 137: 477–493. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0258-8>.
- Trevors, J.T. (1987). Copper resistance in bacteria. **Microbiol Sci**. 4(1): 29-31.
- Twort, F.W.; Lond, L.R.C.P. (1915). An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. **The Lancet**. 186 (4814): 1241-1243. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)20383-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)20383-3).
- Watson, J.D.; Baker, T.A.; Bell, S.P.; Gann, A.; Levine, M.; Losicke, R. (2015). **Biologia Molecular do Gene** – 7ª edição. Porto Alegre: Artmed Editora. 916 páginas.
- Webb, C.; Speers, C.; Ruhl, G.; Creswell, T. (2016). First report of bacterial leaf spot caused by *Pseudomonas cichorii* on sweet basil (*Ocimum basilicum*) in Indiana. **Plant Disease**. 100(6): 1232. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-15-0634-PDN>.
- Weber-Dabrowska, B.; Mulczyk, M.; Górski, A. (2000). Bacteriophage therapy of bacterial infections: an update of our institute's experience. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**. 48(6): 547-551.
- Weinbauer, M.G. (2004). Ecology of prokaryotic viruses. **FEMS Microbiol Rev**. 28(2): 127-81. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.08.001>.

Wilkie, J.P.; Dye, D.W. (1974). *Pseudomonas cichorii* causing tomato and celery diseases in New Zealand. **New Zealand Journal of Agricultural Research**. 17: 123-130. <https://doi.org/10.1080/00288233.1974.10420990>.

Wójcik, E.A.; Wojtasik, A.; Górecka, E.; Stańczyk, M.; Dastyk, J. (2015). Application of bacteriophage preparation BAFASAL® in broiler chickens experimentally exposed to *Salmonella* spp. **SSRCI Vet. Med. Prod. Feed Add**. 16: 241–251.

Yamamoto, S.; Kasai, H.; Arnold, D.L.; Jackson, R.W.; Vivian, A.; Harayama, S. (2000). Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. **Microbiology**. 46: 2385–2394.

Yao, J.; Moellering, R. **Antibacterial agents**. In: **Manual of Clinical Microbiology**. Murray, P.; Baron, E.; Tenover, F.; Tenover, F.; Tenover, F.; Tenover, F.; Tenover, F.; Tenover, F.; Tenover, F.; Tenover, F.; Tenover, F.; Tenover, F.; Tenover, F. Ed. ASM, Washington DC, 1995, pp. 1281-1290.

Yin, Y.; Ni, P.; Deng, B.; Wang, S.; Xu, W.; Wang, D. (2019). Isolation and characterisation of phages against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, **Acta Agriculturae Scandinavica. Section B — Soil & Plant Science**. 69(3): 199-208. <https://doi.org/10.1080/09064710.2018.1526965>.

Young, R. (2014). Phage lysis: three steps, three choices, one outcome. **Journal of microbiology**. 52(3): 243–258. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4087-z>.

Yu, J.G.; Lim, J.A.; Song, Y.R.; Heu, S.; Kim, G.H.; Koh, Y.J.; Oh, C.S. (2016). Isolation and characterization of bacteriophages against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing bacterial canker disease in kiwifruit. **J. Microbiol. Biotechnol**. 26: 385–393. <https://doi.org/10.4014/jmb.1509.09012>.

Yu, S.M.; Lee, Y.H. (2012). First report of *Pseudomonas cichorii* associated with leaf spot on soybean in south korea. **Plant Disease**. 96(1): 142. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-11-0653>.

Zaha, A.; Ferreira, H.B.; Passaglia, L.M.P. (2014). **Biologia Molecular Básica** – 5^a ed. Porto Alegre: Artmed Editora.

Zbikowska, K.; Michalczuk, M.; Dolka, B. (2020). The Use of Bacteriophages in the Poultry Industry. **Animals**. 10(872): 1-18. <https://doi.org/10.3390/ani10050872>.

Zhang, S.; Fu, Y. (2013). First report of bacterial leaf spot on *Cichorium intybus* caused by *Pseudomonas cichorii* in Florida. **Plant Dis**. 97(6): 837. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-12-1185-PDN>.

ANEXO I - FICHEIRO GENBANK

LOCUS. 40117 bp DNA linear BCT 11-MAR-2020
DEFINITION Pseudomonas phage vB_Pci_PCMW57, complete genome
ACCESSION Unknown Unknown
VERSION Unknown
KEYWORDS WGS.
SOURCE Pseudomonas phage vB_Pci_PCMW57
ORGANISM Pseudomonas phage vB_Pci_PCMW57
Viruses, Duplodnaviria; Heunggongvirae; Uroviricota;
Caudoviricetes; Caudovirales; Autographiviridae; Studiervirinae;
Ghnavirus; unclassified Ghnavirus
REFERENCE 1 (bases 1 to 40117)
AUTHORS Alves, M.K., de Souza, W.V., Novello, J.C.L., Sillankorva, S.,
Henriques, J.A.P., and Ely, M.R.
TITLE Direct Submission
JOURNAL unpublished
COMMENT ##Assembly-Data-START##
Assembly Method: Geneious Prime® 2019.2.1
Sequencing Technology: Illumina MiSeq
##Assembly-Data-END##
COMPLETENESS: full length.

ORIGIN

```
1 catagagaga ctcaatgggc ctctatctgt ccctatctgt aagtcctcct tgagtcaccc  
61 ataggcttga cactgagacc atccataggc tatcgcgtgt gtgcgctcat aaggaccct  
121 caaagactgt ctacctgatg acccatagga tcaggctcca tagggatgac ctatcagctc  
181 ttaggcaacg atagaaactc agttgttgac ggaccatgat taatcctgtc taatggctcc  
241 catcaacggc aaactactgag ttgatcgcca cggctctctgg ccttggctct aacggctca  
301 ctgagatgac catagggatc gaccacagag cctataaggg ccacaagctg ggtcgggcaa  
361 tacttcgagt tacctaaag catgtgagta gcaacaaggc ctgaacaaa cgcttgacaa  
421 gatgatggaa cgctgtagaa tggccacat caacaacgca acacggctc actgagatgc  
481 tccacaggt ctgcaaggg caacgaattg gctgatagac acggcetaac gggcaccct  
541 acgctcttta acaactcgga atgctacacc acgactgag ccggctcag gccctcagag  
601 catctcagag aggcttcag gccctcggc cgtggcagtg ataggaaata cagcaagatg  
661 gtcttgtgtg agccaagctt tccacgcaag gactcagat caggaccatc gtctgtatct
```


721 cccgtaaacc ctactgaag gatgcacaac aatgagcgc aactgctgat cgactcaaag
781 acgaactgca ccagctcga caacgcatac aggtagcgc caatgaccac gaggccgcta
841 agtctgcctt tggcgctctt gaagtgcctc ccacgcatcc tatgtggcg gctcttcggg
901 atcgattga ctgcacttg atcaccaac gtgcctgca agcctgctgg catcgcacta
961 aggcaagcct gctggaacaa ctcaacgctg acaaggagcc ggactaatgg ctaaccgcaa
1021 gatagccag ctataagcg gcgagacggg caggctctc cacctgtact acaacagcga
1081 gttcgatgag tacaccgtct gttctacaa gggcgacacg taccaatcca atgcggacta
1141 tcacaccgat gaccgcacgg atgccttga cactgctgac cactggatca agcaaaagga
1201 ctgacacat gcaagcaatc accatcacct acaagggtcc gggcaacgctc cgtggctctc
1261 gcctcatgac taagtgtgac gctgggcagg tactgtgcc gtatgagcac ggtctggaca
1321 tgcacgggaa cgtcgtggac gccactaagg cgctctgcaa gaagctcggg tggactcgtt
1381 ccgctggcta tcgagcgac tggaccgtag gccagacca taagggttc tatgtggccg
1441 tctacacggg tccagatgag cctgacaggt tctgcattga gtgaccattc actcaagggc
1501 gctcgtgag tgccttgg ggaagcaatc accgcacta tcgactcca caactgaagt
1561 aaggtgcac catgaact aagcaactgc aattcatcct cgtcgtgcc gcttgcctgc
1621 tggcagagc atacactcag tgcactgctg agtaccgcgc aatcctcca ctggatggcc
1681 gcattgtct ggacgcaccg agcacctcg aggtctcaa agcggacgcc gctcaaggg
1741 tctcaaggt ctccaccgag cacaacacgt cgagcatcta cgttgctct ggtaacctga
1801 cgttccgac ctccacgac ttcggtcctc tctgtacaa caaggcgttc acgttgaag
1861 acgaagtga actgtccct atgcaatggc aggacttga gggctatct cctgccgagt
1921 ggggtgacgt gtgccactgc gtctatgctg ctgacaccga gcaacaatcg ctgtacgaag
1981 ccgagacggg cgacttccc gctgaccaga aacgctttgt cttgggttc cttgccgatc
2041 acttgcctta atcaacctt gagaatcaat aggtaaaagc aatgcgtac aatgcacca
2101 acttctgtc cgtcgtgtc gtaacgagc tcatcgcgc catccaagcg gtaatcgt
2161 cgggcatccc tcagtacatt gaggaccga aaggccaacg ctggctccgt gtgctctca
2221 agatgctgga cggcaagccg caactggaat tctttgccg caatggcag gaagtcgggg
2281 acgtgatctt gcaggcgtcc ttcattggc acgtgaaga cctcaccgag ttctctcagt
2341 tactgtcaa agttataca atgaccgagc tgcctaccac acctgccga ccagcgaac
2401 ctaaagtga tctgagcct gccgttaacc tgcctccgg tctcgttcg tggcgtctgc
2461 cctctggcct gaccctgtac ggacactggc ggcgcaagt gttccgcaag cgctctatg
2521 tgaccacga ccgcaacggc caactgccgc aaggtgaggg ctactacctc gaccctgaag
2581 ccatgctgta tggcactgc caaggggtgg tcgcatgagc cgggtccttg accatgctg
2641 gaccggcatt gcctcgttg acaagtatca cccgtgctc cgtgaacatc tcccgtacat
2701 caaggagatg gccgaactcg ccgagacgca aggcccaatc actgcggcct gttctctga
2761 gtccagcgtt ttccaaaagt tcttgacga ttgcgtgtg tgcctgac cgggcgtcta

2821 ctcggtcgct tacctgtcgc cacggtactg cgctgagatc ctcaaggaag tcaagaagtt
2881 tectcacacg gtaacgatg aggaaccega ggaagcgcag attcccaggg ttgtcttca
2941 gaacgagcac ccggtctgt tcgaggtctt ccggtccttc tgggcagacg ctggtgtgac
3001 gctggcaaaag gtgctgctcg gtctcgacc tftgaacctg accacctgcc aagccgctca
3061 gtacgtccct acgggcatct caagaggtea ctggcacatc gaccaagact ctgacgtaac
3121 gctcgtggtg gccctcaacg acgaccacaa gggcgggtggc acgatggctc atcgaggtcc
3181 cttcgcacct gctgtcgaagg tccctcaaaa cgaaacgggc tgggcaatgc tgttctcgg
3241 caagacgacc cagcactacg gaatccctgt tategaagge gagcgaacc tgctcgtcca
3301 ctggagtga atcaagtgat gcacacgaac taccaaccgg ccgcccgtgg gctggaa gca
3361 acccggatca tggccgcaa gcgctcgt ctgactaaga acctctcca accaatggtc
3421 ggcgatgagc tgctcgattg cgtcaaggct gagatgcagc gcaagcacct gcgttacagc
3481 gaccgtggcg acttaccgg ctgtatcgg ggagggttct gacatgggac cgattcgc
3541 cacgccacca aacaaccggg tcaagcaggt cgtcttaag gtctctgcc cagacggcca
3601 gtatggtctc cacaagctcg ctgacacgac gttgccctt gggctggggc catgtggccg
3661 ctgggtgcaa gccttgagg tggaggttac agaccacctg ctgaggattc gccagcactc
3721 caccgagttc gacatcaccg aggcagccgc tgagaacgcc gaaagtgaac gcacatcgc
3781 gtaccaccaa ggccgtacc cgtggctcaa gaaggaactg tcggctgacc tgctggagtt
3841 ccacaaggaa cgctcaaca ccaccaaggc cgtcttgcgt aaagcgaacg aaggtacga
3901 gatcaaggag ttatctaca agatcgaga cattcatggt cggatcgtaa ccaccaagta
3961 acgctggatt taaaaccct cactgtggct gcacacacta tgggggctt tctctaaag
4021 acatctcaa ggctatcta aagaccgtcc gtgtgggcag ctcatccta acccattca
4081 gacgattaaa tgaccattgc aattcccga cgtcacgact tcagcagat caattcgtc
4141 gctgcttcg atgcctgag caacatctac ggtcctgcac tcgccgtga gcaactccag
4201 ctcgaacatg aggttacac cctcggcgaa gaacggttc acaaggcaat ggaacggcag
4261 atggaacgag gtgagttct caacagccaa gtacgaaac cgtgctcgg tcatctggtc
4321 ccaatgctgt ccaaggccat cacggattgg atcgaacacc agaccaccaa ggttcgccg
4381 aagcatgtgg ccctggggc gttccaacag atgaaccag agacgatgc atccattgc
4441 atcgtgga ccatcaaccg tatectcaa cgctctggc ctccgacct cactgagatg
4501 gctgtgagca tcggtggtgc cttgaggaa gaagcgcgt tcggtcgc atcgtctc
4561 gagcaacagc actaccagaa acatcaag aaggccctc cccagcga tgggatgacc
4621 tacaaggtc cctatatgga gaaggtcgaa gccacatga tcgaggcagg gcagctcaac
4681 gagccttggc ccgagtgga ccagttggc gcagatgtcc gctaccacat gggcatcgt
4741 atctggaac tgctgatcga atcgaccag ctatcgagg tctccgtga gcacaaggc
4801 aacaagaagc tggacggtga gtatgtctac ctgaaagcgg aatggccga caagctccag
4861 agccgtcct acatctgtc tgggtcttc ccgcgtacc agccaatggt cgtgccgccc

4921 aagccttga acggtgtgc tgggtggc tactggcca aggtcgca gctgtgacc
4981 ttcacctg tcccacaaa gcgagcgtc aaccgtacc gcgatgcca catgccgaa
5041 gtctacaagg ccgtcaacct cgcacaagca acaccgtggg cgatcaacca gaaagtctc
5101 gctgtggcaa acgctgtgat ggctgggag aacgtgcaa tcaaagagt cccctcaacg
5161 gaacgtgaag ccctgccgat caagccggg gacatcgaga ccaacgagga agccttgaag
5221 gcgtggaaga aggcagccgc tgggtgtac cgaaaggac cgcgaagggt ctctgccga
5281 ctctctatg agttctct tgagcagga aacaagtcg ctgagtacga tgcgatctac
5341 tcccgtaca acctcgactg gcgtggccgg gtctatgca tcctgcgtt caacctcag
5401 tccaacgaca tgacaaagg catcctcag gctgcaaa gtagccggg gggcaaggac
5461 gggatcgagt ggctgatgat ccacggtgc aactgtccg gggtcgataa ggtgacttc
5521 agccagcga agcagtggat caaggacaac gaggaaatga ttctcgctg tccccagac
5581 ccgctcatca acaccgactg gatggacatg gattgccct tetgcttct ggcgtctgc
5641 ttcagtggc aaggtgtgaa gctccacggg gaagccatg tcttgcct gccgattgc
5701 ttcagcgtt ctgctcggg cattcagcac ttctctgca tgctccgtga tgagcgtgt
5761 gtcgtgctg tgaacctgt cccgagtgt gacgtacag acatctaca gctgtctgc
5821 gatgaagtg agatgccct tcagtgggac ttgaagtac gcaccgagga tccacggta
5881 ctgacacca acgaggacac cggggagatc accgagcgtc gtgtcctgg aaaaaaac
5941 ctgctatgg cgtggctcac ctacgggatg tccgaaagg taaccaagc gtctgtatg
6001 accctgcct acggatcga agcctacggg ttcgccatc aggtcgtga ggacatcgt
6061 aagaaggcca tcgacaacgg tgacggtgag atgtcaca gtccggcga agcgagccg
6121 tacatggctg gcaaatctg ggactctgt agcgtcgtt tggctcgtc tgtggaagca
6181 atgaactgc tccagaaggc tgccaagtg ctggcctct aggtcaagt caagaagacc
6241 aagcaggtcc tgaagcctgc aatgccgtc tactgggtca cgctgatgg ctcccggc
6301 tggcaggagt acatgattc cgagaccgg cgaatcacc tgatgtct tggcagctt
6361 cgattcaag cgaccgtgac tgcggagac agcgacaaga ttgacccc caaacaagag
6421 tgggcatct cccgaactt cgtccactg caagatggct cccacctc caagactgt
6481 gtccacgtg ccgagcggta tggcatcag ttctcgtc tcatccaga ctcttcggc
6541 accatcccg cacacgtgg ggccatgtc aaggcagtc gcgagacgat gtcgagacc
6601 tacgaaagca acaacgtct tgaggactc cgtgagcag tcatggatca gctccacga
6661 tccaactgg acaagatgc accgatcct gagatggca cgctggacat ccgtgaaat
6721 ctcaaatcc aattgcatt tgcataagga atccaaacc atgtcgtc gtaactcga
6781 gaaaaccacc cgcaccaacg ctgccgctc ctccaggaa atcgagcagg tccgtccaa
6841 gaaaggcaag cgcaacaagc aagcccgtg cgtcgtcag gtaggtctg aagaatgaa
6901 ctacagaac tccggcagat cgtcgtgac caccctaca accagacgt gaccatcag
6961 gtggcacc cgtgagtg cgtgagatc accattgact acttcacca caagcccg

7021 ttgatagtc aagcgtggc ccgtgaggt cgggtgaatc ctgacctcat actgctctac
7081 caatttctgg ctgaagaagg gcgggtcatc cacctgtccc tcgacatcgc ccaacaaacc
7141 atccagtacc tgaaggagac caactaatgc aagtcactat cgccgctacc agttccgtgc
7201 tggacaacaa catggtcctg atcgagacct cagtgacct cggtgaggct gtcaccacca
7261 cccgagctgg ttacgacaag cttgagctga tggacaaccg ctatctctcg ggcaccttg
7321 aggaacgtgt cgaagccctg cgccagtcg ctgagcgtat gaccgagacc agcgtcaagc
7381 tgcactcca agcgtcgc aagatgcct cgccagaagc tctggtgacc gacgtggct
7441 tctctggggt cggcgtcaag gccactcagg aactcgtga gaaggtcag caggcgttg
7501 aagcacccgc caagaagacc cgtaagccac gcaccctaa agccgccag taaggagcaa
7561 ccaatgtcc aaagtgaat ccgtcatcct gaacaccaag ccgtccgcc caaccgacta
7621 caacgagaaa gccatgcagg ccgtgctga cgagctgtac ctgcaagtgg acgtgaagaa
7681 ggatggcgtt cgcctcaacc tgtcgtctc tggcgcgct cactggtca acgtgagtg
7741 gctgtcccgt gaaggcaagc gctcccggc tctggtccag tacctgcaag gggacgagcg
7801 ctggtccaag ttctacaacc cgcacctcgg tgaagccctg ttcaatgacg aaggttcat
7861 gctggacgct gagttgatcc tgctggacga ccacggcaac gagaagaagt gcaagaacac
7921 ctcggcgat cttcggcga aggacgagcc ggtgccgctg aatcgcattc ggtctacgt
7981 gttcgacatc gtccgctgg acgtgatcgc tgaggcctc gagtacgatg tcatgcagtg
8041 tgcctgaag ggccacgtg agtaccagt cgccaagctc aaggaatact tccctgagat
8101 cgactggatc gtcgctgaga cctatgaggt ctactcgtg gaaacctgc cggctattga
8161 gcgccctcgt gttgacgagg atggcaacga gatcaccgtg accctcagc caccgctgag
8221 cctgaccac ctgtaccca ctgtccgta gcgtggtgag gaaggtctgg tctgcaagga
8281 cccgatgggc ttctatctc gctccaaggt gagcggctgg tggaaatgg tgccggacga
8341 caacgaggat ggcgtggtc tgggtctggt ctggggcacc gatggtctc ccaacgaggg
8401 caagtgatc gggftcaagg tcaagctgga gctggtcat gtggtcaac cctgcaagat
8461 cagccgcgca ctgatggac agttcactc ggctgtcgtt aaggttcca atgacgcta
8521 cggcgaaagc cagtgccga ctgacgatca tgttgggtc gacattcaag acgagtcgat
8581 caaccatac gaggaccaca cgtcaaggt gacgttcat gacgctacc ctgacggtc
8641 cctgcgtcac cctcgttcg attcctccg gggaaatc cgcgccacca tcaaggagta
8701 actcaacgag cctcatcgac ttcggtcgtt ggggctttt tgtgctcgc acgatagggg
8761 aaatctatgg gatggaccgt tctgatagtc gtttgaacc tgctctggat cgtctgtgt
8821 tataggttcc gatgaccgga tttaaaacc ctactttgg ctgcacacat cgaacaacc
8881 aaaggaggtt cacatgacc aactgtact gttcacagc aacaaaggaa ctggccact
8941 caccgtcgc caagaccgc agatcgttaa atggctggc aaggttccat tccatgccgt
9001 tctcatcaac ccgtcggca ccaagttcct cgtaaccaag ggcaccttg cgcaatccc
9061 aaagtgggc cgcattgtc tcaaacceta caccggcaaa ttcctcgt gtgccctcgt

9121 ctggcagatc gtgaaggagg tcttcgcatg agccgggtga ttatcgtct gacttctgag
9181 cgtggtcgct cgggcaaaga caccctcgtt gagctgctcc gtgaggaaagg cttcgaggtc
9241 tatcgggtcg ccttcgggga tctcctgaag caccagtgtc cgctcgtct gacagattgc
9301 cgtgaggctc agattgtcat ggagagccac atgcacacgg acctgaagga tgcccgttt
9361 gaagaactgg cgatcaacga gattcccga a g tgaatacc gcgattggct ggtcgagcag
9421 catccgacct acgaggacca tcacgagcct cgctcacctc gctggcatct ccagcagtac
9481 ggacttggt tccgtcgcaa ccacaaggga gacctgacg tgtggctcaa cgaggcctc
9541 aagctgatc aaaaggcccc tgaagattcc ctcgtggtcg tcaccgacat gcgccaagcc
9601 aacgagtatc tggcccttga gggctcggg gctcatctgg tgcgctgat ccgtggctgg
9661 ccaatcgagg ctgtggactc tacgccactt cagccaccg acatcgagct gcgcgaccac
9721 gttatggacg ccgtagtga gaacgaatgg ggctatgcca gcgacatgct ggttcagtc
9781 cgagcacaag gagtaatcga atgaaacgag acaccaagat gaagctgtc aaggcaactg
9841 tgaagtccg tggcgagatg caggaagtgc cgatctgggc tgagtccatc gagaccgctc
9901 tgaagtggc cgatctggag tatggcgaag acaacgttta ccggctgct ccagaggtga
9961 cggatgaac cgcgccaag gcaacaccg gtcgatgct gatgcttcc tgcacatcca
10021 gaacttcacc gtgaccaaac actctggcat ggccggggtc gtctacatcc acctgatgac
10081 caaggaacaa caggaaatcg ttgagtcct tctggttga cgtgcgacgg tccttgagtc
10141 catcgtgag gatgctggcg tgcccactga ggtcgtccat gtgaagcacg gctgcttccg
10201 gttccgaaa gagtctccta aggagaactt ccgtgaggtc gtccatgca ccaccaagat
10261 caccgcccag ccagtcattg aggactcaa aaggaagctg atcggcagc gcgaatcgt
10321 ctctattaa aaacctcac tgtggctgca cacattcca actgattcaa aggagacat
10381 cacatggcaa agtccaccaa gcaattctg ttcactccag tcggcaccgc tgagccgtac
10441 tgctgatcc agaagcctga cttcggcaac cctgagaagg gttcggcaa ccctcgtggc
10501 gtctacaagg tctcgtgac cattcctcg cgtgaagccc agccgtgat cgacaagatc
10561 accaaggctt acgacaagaa ctgggctgag atcagcgaag cgtgggagaa cggcggctg
10621 gctgctgctc aagccaagct ggcccgtggc aagaaactgc tggaaacctc tcagggcgag
10681 ctgctttct tcgagaacga ggatggcacc gtcacctca agttcagcgg ctatgcctcg
10741 tacaaggacc agaagactgg cgagaaccgc gacatcgtt tgcgtgctg tgacgccaag
10801 ggcaagcgca tcgaagccgt tctgcccac gctggcgggt ccaagctgaa ggtccgctc
10861 tcgatctcc cgtacacctt cggtgccgtt gttggtgcca gcgtgaaact gcaactggac
10921 agcgtgatgc tgatcgagct gcgcgagttc gctgctggtg gtgacgactg ggctggtcag
10981 gaggaagaag gttcagaggc tctgatgac cgcgaagaag gctggcgcgg tgagcaaggc
11041 gaagaagacg aagactcga ccagtacggc tcggcgact tctgatggt tacgctggtc
11101 cgaagggtgc tcgtacaggc gccttcgtt ctggcctcga agaccgcaac gcgaagcata
11161 tggacaagct cggggtcaag tacgacttcg agcggttcca catcaactac gtcgttccgg

11221 cccgcgatgc caagtacaca cggacttcg tgttgccaa tgggatcatc atcgagacca
11281 agggaatctg ggaagtgac gaccgcaaga agcacttgct gattcgtgag caataccctg
11341 accttgacat tcgactggtc ttctgaact ccaactcga aatctacaag ggttcgccca
11401 cgtcctacgc cgactctgc acgaagcag gcattcaatt cgctgacaag ttgtccctc
11461 gtgactggct gaaggaggct cgcaaagaga taccceaagg ggttctcgta ccgaagaaag
11521 gaggttagtc atggccaagg ttcaattcaa accgcgtcca gccacggact tcatcgtggt
11581 tctactgtgc gctaccaagg ccagcatgga cataggcgtc cgtgagattc gccagtggca
11641 cgtccagcaa ggctggctc acattggfta ccacttcgtc attcgtcgta acggcacctg
11701 cgagaacggt cgtcctcacg atgtcatcgg gtcccacgtc aagaactaca acagccgagc
11761 gctgggcatc tgcctcgtg gcggtatcga cgacaagggt caaccccaga acaacttcac
11821 gcctgagcag ttcgcatcgc tcaagctgct gctgatcgc aacaagcgtc agtaccgca
11881 agcccagatc gttggtc atc acgacctega ctctggcaaa gcctgcccgt cttcaaggt
11941 ctctgactgg ctcaagacgg ctggcattta aaaacctca ctgtggctca catggattc
12001 ttccgtgtgg gcctcttgc gttgacttta ggaggacatt atgaaccgtt ccttactgca
12061 aggcggttgc gacctctgtg agcatctcat tggactgggc atcggcgcga tcatcgtggt
12121 tggctgtgcc cgtgacctgt tcttcggggt ggaaccgaaa gacatcgaca tcatttgcgc
12181 gggcagtgac ccggagacag ttccagagc gctc gatgaa ggtggttatt cctacgagaa
12241 gttcccaag taccacaccg ggtctgactc ggatcggctg caaggggtct ggaagatcga
12301 aggctcgaac atcgactgga tctctacga gaccgattgt gtctccgagg c gatccagaa
12361 gttcactac aacctcaacc agttcgccat cactggcatc caaaggggca tcgaaggggc
12421 gaccattcgc ttcatgggtg cgagccattg gagcaacctt gtgactc cgtgaggatgc
12481 tcgtgggtc cgtgccgaga agatggaa gc caagtggctg gcgctgatc g acaaggctcc
12541 aaacgtggat gagcgggagg tggctgatgt cgtctcctga agaaagcgaa agcgtattcc
12601 tgaagacat ccctgtgag aactgtgggt ctcagatgc caactcgctt ttcagtgcg
12661 gccaccagt ctgcttgc tgcgacct atgtcaagg tgatggcga g tcatctggtg
12721 agcgcgtcca gaaggagc aactctgact gcatcgagtt cgccaagtcc caaggtgat
12781 tccaagacct gccagctcgg ttattcagg aggtatctg ccgccagtat ggctactggg
12841 tcggcaaggt ctggcaccg atcaagcgtg aagtggcat ggctcaagt gccaactact
12901 acgatgctca gggcaacctg acaagccaga aggtacggga cgccaccaag gagttctca
12961 ccgtggagc acacgacaag gacgctctgt tcggtcgcca gctctggtct ggtgctgca
13021 agatcgtggt caccgagggc gagatcact gctgacagt ggctcagttg cagggtggca
13081 agtatccagt ggtctccatt gggcacggct ccaaggcagc gaagaagacc tgcgccagta
13141 actacgaata ctcgacacg ttcgacgaga tcatcctcat gttcgacatg gatgacgtg
13201 gtcgggcagc ctctcaggag gccgctgagg tactcccacc gggcaaggtg aagatcgtg
13261 tcttccctt caaggatgcc aacgagtgc tcaagcagg caacgccaag gctgtcactg

13321 acgcatctg gaatgcccag ccgttcgtgc ccgatgggt cgtctctgcg aagtcctga
13381 aggcccgcct gaaggagaag aaggtgatcc ctccgttcc tctggtgcc cctcacgaac
13441 tcaagaagat gaccaaggac tccgtggcg gtgagtgat cctcgtgacc tctgtagtg
13501 gctcgggcaa gtccacctc gtgcgtcaga acgtctaaa cctgttccac aacgaggcca
13561 tcccgtgtgg cgttgccatg ttggaggaa g cagtgaagg aaccgttcag gacatcgtg
13621 gcctgcacat cgggtctcgt gtccgtcaga accctgatga gaccactgag gaagtcttcg
13681 accgcgcctt cgtgaaatc ttcgagagc acaagctgtt cctgatgac gcctttgcgg
13741 aagccgctga ggatcgtctg ctggcgaagc tggcctacat ggtcaggcc gaaggttgcc
13801 ggtaattgt gctcgaccac atctcgattg tctgtctgc aatggacggc gatcaggacg
13861 agcgaagac catcgaccga ctgatgacca agatcaaggc attcgcaag accaagaacg
13921 tgcagtgtt cgtgatctgc cacctgaaga accagacaa gggcaagcct cagaggaag
13981 gccaccaat cgtggtcacc gatctgcgtg gctcggcgg tctcgtcaa ctgagcgaca
14041 ccatcatcgc gctggagcga aaccagcaag gcgcattccc tcatcatc ctgtccgcg
14101 ttctaaatg ccgcttcacg ggcgagcgg gcgtggctgg atcatcgt tacgacaaag
14161 caactggtc cctcgaacca atgccggaag gctggaacc cgaggacaca tccgaagccg
14221 atgaggcgtg gaaagaccag caagaaccg actttaact gaaggagaac caccatga
14281 aagcactgaa atcgttcgac atcgttaccg ctctgatcgt tctggctggc cgcacgcca
14341 agcgtcgtca cgagaagctg gtggcccgtg aggccgctct gaaggctgcc attcggcta
14401 cccaagctgc ctatcaggac accgtgagca agcgcgtaca ggccgactgg cgtcaccaag
14461 acatcacccg agtgaagtaa ctcaaggggt ctttcgggg acccttcgg ttaactaca
14521 cgccactcaa taggagatac accatgaacc attccgacat ccgcaatac ctgaagcaag
14581 gcgagcaggc ggtcgtggt ctcaagtcgc tgggtacac ctacgtggc aacggcaag
14641 agcacctca ttgggtggcc cctgtgaacc ctctgacc gatcattgag ggcacaaat
14701 cgtggtctc cgagcagtc gctgcacca tcaaggagga aacctgaag gcatactca
14761 agggcgaagc tgacgcgac cgcaacaccg atctgcgtg cctcaatgg gactccgtga
14821 aggacctcag gggctgccg ttacgatca tggctgcaa gattccgagc cactcgaac
14881 tccacggta ctgatgacc cacttacca atcggcagtt ctctgcctt gaggtgcgt
14941 accaccgctc gcctgagtac accggctatg ccgtgtgtt ctcttccc gtgcgtccat
15001 tccacctga gactgtctgg ctccactga ggcctcgt ctccgtcga taggaggca
15061 accatgctca tcttgacat cgaacgaac ggcctcctg agaccgtcga taagtccac
15121 tgcgcgacca ttcaggactg gttaccggc cagtacacgc gttcaatga ggccacctt
15181 ggggactaca tcaagccct cgaagctgag gctgcgaagc cggatggtct catcgtgtc
15241 cacaacggga tcaagtacga catccctcg ctggacaaac tgaagcgtca atactcggc
15301 aagcgtctga acatccctc caagaagtg ctgcacacgc tggfactggt gcgactgatc
15361 cactcgaaca tccgtgacc tgacgtggg cttatgcgt ctggcatcct accgggcaag

15421 atgttcgggt ctcactctct ggaagcgtgg ggctatcgcc tcggtgagat gaagggtgag
15481 tacaagcacg acttcatgcg ccagctcgaa gcggacgggtg gcgtctacac gccgggtctc
15541 gaatgggctg tctgcaacca agcgatggag gactactgcg agcaggacgt tcgcgttacc
15601 tcgaagetcc ttcggaaact catggaggac tcccactact tcgtggatgg tcaagccatt
15661 gactgtgtcc gtatggagca cgctgctgca tggacgctgg cccagatgga gcgcaacggg
15721 ttcccgttcg acctcgaagg tgctgagcga ctctatcgcg aactcgcagg gattcgcmaa
15781 gacctgctga ccaagctcat caagacctc gggtcgtggt atcagccgaa aggcggcacc
15841 gagcagtcc gtcacccggg gagcgacaag ccgctggaga cgtggaccaa tgggccgttc
15901 gctggtaag ccattcctcg tgtgaagtat ccgaaggctg gtgggtgta caacccaac
15961 ggtaaaacca aggacaagc gtagacctc gctggggcac catacaccg gctcgaattc
16021 gtaacctca acccaacgtc acgccctcac atcatcaaga tgctcaagaa ggctggctgg
16081 gaacctctg agttaccga caacgggtgct ccgaagggtg acgatgaggt gctcgaacac
16141 gtccgcgtg atgaccaga gaagcaggca gccattgagc tgatccgtga gtacctgatg
16201 atccagaagc gcatcggcat gttggccgaa ggcgacaacg catggatcaa gctgggtggg
16261 gaagacgggt cgatgcacgg ttcgatcaac ccgaacggcg ctggtactgg tcgagcgacc
16321 cacgectacc cgaacatggg tcaggctcct tctgcgagtg ccacctacgg tctcactgc
16381 cgtgcgtctt ttggggcgac ccatgcgaag aagcgtgagg gctgggagaa ggtcgtcaa
16441 gtgggcaccg atgcgagcgg ccttgagctg cgttgcttg gccactatgg ggcaccttt
16501 gacgaggggtc gtacgctga caccgtgctc aacgggtgaca tccactgggt caatggcaag
16561 gctgctggca tcatcaagtt cgacgagcgc gataagcaca acgaagaaca tgagcgtgct
16621 cgtggcatcg ccaagacgtt catctatgcg ttctctatg gcgctgggtga tgaactcgtg
16681 ggttccttg tgggtgggtg taagaaggaa ggcaaggccc tgaagaaga cttcatggag
16741 aacaccccgg ccatctctgg cttgcagggt gcgattgccg accagctcat caccgagcag
16801 aagtggaacc aagcgaccg ccgttcgac atcaagtga agcgtcgtg gctgcgtggt
16861 ctggacgggtc gcaagattca tctcgtcgc cctcactctg cgttgaactt cctgctccag
16921 tccgctggcg caatcatctg caagaagtgg gtcgtcgaag tcgaacgaat cctcatgga
16981 gaacatgggc tttaccacgg ctggtacaag gacgatggca cggccgggga cttctgctac
17041 atggcgtggg ttcacgacga actccagatc gctgcacgta caccgagat cgtgagatc
17101 gtcgctaaag tgcccaaca ggctatccgc gaagtgggtg aatctttcca attcgttgc
17161 caactcgaca ctgactaaa gatcgggtgc acatggcgc agtgccacta aggagaaccc
17221 aatggccaag actctgaaac tgaacgtgct cttcccgatg accatcgtgg ttgcgaccga
17281 caccatcacc gctctgaagg caaccctgga ggaagcccgt ttgatccccg ctgagaagat
17341 tgctgagctg aagggcgaga ccaagttccg cgctgagctg ttcgtggcg acaagtccga
17401 ggaagaactg ctggagctga tctaccgcg aggcacccgt gagttcatca ccaaggacat
17461 gcgcaacgag atcgaggca acgaagccaa gattcgtctg ggcagcgtta aggtctcctt

17521 cgaggacaac tccgtgttg cccggctgtg cgactgcaat gcctgctac g agtgaagat
17581 cgccaacggt ggccgggatg aatgagtacc tcgtgacct ctggggactc aagaaggctg
17641 cccgtgcgta ccagagcgac ttcgttcgtg gtcgcattgc gctggtcaat gaggcagctt
17701 gccgggggca catctcgtgc ctctcgactg ccgtaagaa catgggcttc tggctctca
17761 ccacgagcgg ccagcagttc ctgcacaat atggaggtgc cctatgagca aactgaaagt
17821 gggcctcgc cttgacatgg actacctcat ctctcggcg atgtctgcca gtgaggaaaga
17881 agtggactgg ggcgaagac g tgtggacgct gaactcgat cacaagaaag cccgtgacat
17941 tctgttcggc acctcaaga ccatcaaggc ggacatcgct gggcagctca agcgaagta
18001 caagctggcc cctgaagcct acgagttcgt tgacctgtgc atcctgtcgg gcgacgacaa
18061 ctggcgtaag gaggtcttgg agacctaaa ggccaaccgt aagggaagc gcaagccagt
18121 cggctaccg cactctgcc aaggatcat ggaccactc ggtcctgagc gttcctcaa
18181 gtggcacggt gtggaagggt acgacgttg cggcatcctg atgaccaatc cgggtctcgc
18241 tggttgcgac cgggttatct cggtagctg cgacaagac ttcaacacgg tccccggtta
18301 cttctctgg ctgaccaga tggagctggt gaagaacgac gaggcaactg ccgacaagt
18361 ccacatgac cagaccatga tggcgacgt taccgatggc tatggtggca tccccggtg
18421 gggcaaggag accgtaagg agtctgtga gaacctgag ttctctatc aggccacaa
18481 ggtgatgaa tctggcccc gcaagggtga ggaagtgtcc tactggacct cctgaagag
18541 cggtagcag cagttcagc tgtccaagg tctgacctc tgggctgca tggcgtccct
18601 cgcagcgaag caggggatgt ctgaggaaaga cctcatcgtc caagctcagg tcgccgtat
18661 ctgccgcgca agcgactc atattggacac catgaagccg atcctgtggc gtcctcacga
18721 tctgtctctg cgcagcagag ctgcctaaa accctcacta tggccatagg ggaccgttag
18781 gttatctctg tggcctttc gttaatgga gggccaatgc taaaagttat ccaacatcac
18841 atccaaaacc ctgatgacat tctgacatc gctccagccg ctgctgagta cctcgtgta
18901 cgctgaac g cctctacct gatgccact ggcatcgtgg atgacctgc caaacaggcc
18961 tactccgagg gctacattgc gggcttctt gacggtgcta acgctgctgt cgagatcacc
19021 gactgatgc aggagctca gttacagaag gaggaatgac catgtgctc aaatccaagg
19081 tcaagacccc aaagaccaat cctgattccc tgaaggcacc cgagccggtt ctattgagg
19141 aaccaagggt tgtggactc ggggcctcgg aagatgacca atcgaccgag actgggaccg
19201 actctctgaa ggtcaagaag gactccacca gcgacaaggg tgatgggtct accaccgcca
19261 ctgccaagga taccggcatg ggcaagacca tctctgcgcc tgtcaagcgg gcaatgaaga
19321 aggtcacaa gtgataacc aatggcgtca atgccccgac cgagcgtct tctgtgagc
19381 tctgaggag atcattgagc agttccctga gatgacatgg actcgttct ttacgaggc
19441 ccatgcagaa atctgtcgg cactgagtc actcagatg tgggtc gac tggctgtgag
19501 agatgcctct gggaaagtc tggggttcgc ttagcgacg gacgacgat acagtcatgt
19561 ggtgccccct ctggcgctcc agtggcgc at ggtctttcca gaggccccag cgggcacctg

19621 catgaagctc caacgtggcc tcgtaagct ggcccgtgaa tgcaactaca aggtcatggc
19681 gtatacccac cgagtgggcg aaggacgcta tgagatcaac tacacgaaac tgaaggagaa
19741 acccaatggg caagaagatc aagaaggccg ttaagtcggt caccaagagc gtatcgaagg
19801 tcgctggcgt ggcctctggt ggcctgctgg gtggcagtga agacaagccg aaggaagtgg
19861 tccaacaggc cgctcctgtg gaagctcctg cgctgtagc gaacgctgct gctgtggtcg
19921 aggcaccgaa ggattccagt gacagtgagg acgattccga caccgaagct gcaagaagg
19981 ctgctctgct caagggcaag cftggtctgt cggtagctcg ctctgccggt actggcatca
20041 acatctgaca aggaggtgac cagtggccga gaccaaacga gaaggtctcg ctgaggaagg
20101 cgcgaaagcc gttfacgaac gactgaagaa cgaccgagta cttacgaga cccgtgctga
20161 aaactgcgcc aaggtcacca tcccttcct gttcccaaaa gactccgaca acagctcgac
20221 tgactacacg actccgtggc aggcagtggg cgctcgtggt ctcaacaacc tgtccgcaaa
20281 ggtgatgctc gctctgtcc cactgcaaag ttggatgaag ctgaaggtct ccgagtggca
20341 ggcaaagcag ctcgtagcg acccctcgca actggctgtg gtggaacaag gctcggcat
20401 ggtggagcgc atctgatgt cctacatgga agccaacagc taccgagtga cgctcttga
20461 gttgatccgt cagttggccc ttgcaggcac cgctctgac tacctaccac cacctgacgc
20521 ctctgccaat tcgtacaacc cgatgaagct ctacacgctc cacaacctg tggccagcg
20581 tgacgcctc gggaaactct tgcagatcgt gacgctcgac aaggtggcct atcggcact
20641 cccagaggac gttcgaaca gcctctctgg tggcaagag tacaagccg agcaggagct
20701 ggaggtctat accacattt acatcgacga cgagtctggt gacttctga gctatcagga
20761 gatcgaaggc gttgaggtcg atgggagtga tggcagtac cctcaagatg ccctgccgtg
20821 gatcgtgtg cgctggacca agcgagatgg cgagcactac ggacgtcac acgttgagga
20881 atacctggc gacctgaact ctctggaatc gctcaatgag gccatgatta agttgccat
20941 gattagctc g aaggtcgtc gccttgtaa cccaacggg atcactcagg ttcgtctct
21001 ggtcaaggct cagactggtg actcgtggc tggccgtaag gcagacattg agttcctgca
21061 actggagaa g accgctgact tctctgtggc caagtccgtt gctgatgcca ttgagcacg
21121 cctgagctac gcttcatgc tgaactctgc cgttcaacgg tgggtgagc gttgaccgc
21181 tgaggaaatc cgctacgtc ccagtgaact ggaggacacc ctggggggcg tctattcgat
21241 tctctcgag gagctgcaac tgccaatcgt gcgagtgtg ctcaaccaac tgcaagcgac
21301 ccagcagatt ccgaacctgc ctcaagaagc tctgagccg accgtaacga ctggtgccga
21361 agcactggc cgtggcagg acctcgataa gctgaccag ttctgaac ctgtggcaac
21421 cgtgtcgag ttgaatggtg acctgacct gaactgaa aacatcaagc tccgactggc
21481 caacgccatc gggattgaca cggctggtct gctgctcacc gaggccgaga aggetcaagc
21541 gcaatccaa gagatgctca agcagggtgg cctcaacgct gccgctgta ttggctctgg
21601 ggtcgtgct caggctaccg caagtcccga agcaatggag tccgctatgg acaccgctgg
21661 ggttcaaccg gggccaatcg ccaactcaggt taaaaccct cactatggct gcatggagac

21721 ttctctgtgc ggccttcttt ctgataactc aaggagacct caatgtccga catttatgcc
21781 gagttcggcg tcaacggggc agtcatgtcc agcaacaaca tcaccgagca cgagcagaac
21841 atgctggctc tgccgacctc tgtccgtgat ggcgatgagt ccatcgagac catcgacca
21901 gagactgaag tcgagctggg caccgagcag gatcaggaga ccgatgtcga ggctactgac
21961 aacgaagctg gcgatggtga gaacgatgct gctgaagaag gcagcgaaac cgagttcacc
22021 ccaactggcg agcctgatgc tgagctggtc gaatccagcc gtcagatcga cgagtacgcc
22081 gaaggttca gccagatgc cgagcaggcc atcaaggctg gtctcagtgc cgaagtggcg
22141 gaccagatc g aagcagaata cgagcgtgac aaccagctct ccgaggcgtc cctgaaggcg
22201 ctgaaagcg tgggctacag tcgcggttc gttcgtcct tcatcaacgg tcaggaagct
22261 ctggcgaaca cctacgtggc ccagattcag gttacgctg gtggccctga gaagttcaa
22321 gcgatcctgt cgcacctaa tgcgacctg aaggacgcc tggcttctc gaaaaggcc
22381 atcgatgc aagacctga cgccatcaag accatcatca acttgggcat ggcgagccac
22441 accaagaagt tcgtaagac ccctcaactg tcggtcacca agcgtgcccc agcgtccca
22501 gcggctgcc gtaagagcac cgtcgaggc ttcgctcgc aacgcgagat gatcgtcgc
22561 atgtccgata agcgttacc agatgacgct tctaccgtg ctcaagtga ggcccagtg
22621 ggcgctcga gctggtgta cactgattt aaaacctca ctatggctgc atgagagtc
22681 tttgggatga cccaaggac tccatgtcc tatcaattc gaaaggaga actacacatg
22741 gaaaacgaa ctggcggtca acaaatcgtt gccaaccaag gcaaggcca atcggtgct
22801 gaaaaactgg ctctgttct gaaagtctt ggtggcgaag ttctgaccgc atctgtcgt
22861 cgtccgta ctatggaca acacatggtc cgtaccatcc agaattgta gtcggccagc
22921 tcccggta tgggtgcac caagggtac tacctcgtc cgggtgaga cctcagcag
22981 aaacgcaagg acatcaagca tccgagaag gtcaccaga tcgacggcct gctgacttc
23041 gacgttctga tctacgacat cgaagatgcc atgaaccact acgacgttcg tgccgagta
23101 agcggccaac tgggtgaagc tctggccatc gccgctgac gfgctgttct ggctgaaatg
23161 gccagctgt gcaacctgcc tgctcgtcg aacgaaaaca ttccggctt gggccaagcc
23221 gttgtctga acatcgtgc tctgctgat ctggctgat tcgaagctc tggtaaagc
23281 atctgaagg gcctgactt ggctcgtct cgcctgacca agaactacgt ccctgctgt
23341 gatcgtcgt tctactcgc ccagaagac tacagcga tctgtccgc tctgatccc
23401 aacgtcga actacgtgc gctgatcgc ccagaaaccg gcaacatccg caacgtcatg
23461 ggctcagag ttatcgaagt tctcactg accgtgggtg gcgctggcga caacaacca
23521 gccgatggc tggctccgac caaccagaag cacatctcc cggctaccgc tactggcgat
23581 gaccgtgtg ctgagaaca cgtggcggc ctgttcaacc accgttcggc tctggcacc
23641 gtcaagctga aagacatggc tctggagc gc gctcgtcgc ctgagttcca agctgaccag
23701 atcatcgca agtacgcat gggtcacggc ggtctcgtc ctgaagctgc tggctcgtg
23761 gtcttacc cagccgcta acggcaacc aaacccttg aggccttac ggctttgag

23821 ggtttttca ttagggat caacatgccc tctacgaag caaacctga aacagatgac
23881 gaactcgag ccatcaacga catgctgca gcaatcggg agtcccctgt gaggctcctt
23941 gagggggacc ctaacgctga cgtggcgaac gctcgccga tctcaacca agtcaaccgc
24001 gaagtcaat cgcgtggctg gacgttcaac attgaggaag ggcagtgct cccccggac
24061 tcttcagtg gactcattga gtacctctg gactacctc ggatcaccac ctcgggtggc
24121 accgtttac g taaaccgtgg cgggtacgtc tatgaccgt cgaccaagac cgacgtttac
24181 accaacgaca tcacggctga tctgatccgc ttaagacct tctctgagat gcctgagtg
24241 tttcgtcgt acatcgtggc gaaggcttct cgacgttca acatccgctt ctcgggtgct
24301 ggtgagatc g aagggtctct gcaagagcag gactcggag cgtggcaaca gtccaagag
24361 tacgaactgg actacggcgg ttcaacatg atcgacggg actcttacgt cgggtggcctc
24421 gcatctgat aaggaggggc tatgggactc gtttcgcaat ccgcaagaa cctcaaggga
24481 ggtatctgc aacaaccaga catctctcgg tctccaacc aaggcgtct gcaaatcaac
24541 ggggtgctc cggagactca gggcttcag aagcgtccac cgaccacct caccaagcga
24601 ctccagaaca agggttctc cggcaccag ccgctggtc acctatcaa cgggacgcc
24661 caagagcaat actcgtggg cttctctggg actggtctgg cagtctggga cctgaagggc
24721 aacaactaca ccgtgcgtgg ctacaacgt tacgccaact gcgcaacc tcgaccgac
24781 ctgcgctca tctctgtggc cgactacacc tctgtgtaa accggaacac cgtgtccag
24841 atgggatcga ccctgacaa tgcggcctac ccacggctgg atgctgagc gctatcaac
24901 gtgcgtggtg gtcagtacgg tcgaacctg tcatcaca tcaacggga cggcactggg
24961 tccagctc aagcgtccat taagatccc aacggttct cgagaagg gcctgctggt
25021 gatccctat cgggcatgaa ccaagtggc atgacggag cctcatggt cggcgtgag
25081 ctggctcggc aactgacgt cttctctggg ggctctgggt ggtcgtcca agcaggcacc
25141 ggggtgattc tcatcaatgc cctgccaac gacaactgc gccagatgc caccaaggac
25201 ggttacgtg acacctact cagtgggtc atctatcagg tccagacct cacgaagtc
25261 cctgcgaac ccctcggg ctacctctg gatgactg gggagtctc acggtctgt
25321 gacaactact ggtccaata cgacgctct ggaagggtc ggaaggag agcgaagccc
25381 aagatcatc cagggtcaa caacgcaac ctccacac cgctcgtg gggcgtgac
25441 gggcagttc actggactc cctgacgtg gatggacgca acgctggtga cgtgacacg
25501 aaccaatgc cgtcctcat cggcgttc atcaacgag tgttctct caggaacct
25561 ttgggttcc tctcggcga gaacgtctg atgtctgga cctcgaagta ttcaactc
25621 tcccagca gctggcgac cctgagcgt gacgatcaa tcgacgtggc catctcgc
25681 aaccgatct cgatctgaa gtacgtctg ccattctcg agcagctct gctgtggtc
25741 gaccaagctc agttctct gtcgagcaac ggcactct cgagcaagac catcgagctg
25801 gacctgaca ctgagttc cgtgagcgt ggtcccgtc cctatgggt tggcggg
25861 gttactctc cagctccac ggctctc acgtcctca aacggtacta cgcgattcag

25921 gatgtctctg acgtgaagtc cgctgaggat gtctctgcgc acgtccgag ctacatcacg
25981 aacaccgtcc acgctatcca cgggtctggt acggagaact ttgtgagcat ccttcggac
26041 ggctcgccaa acaaggtatt catctacaag ttctgtacc tcgacgagat tctccagcag
26101 cagtcctca gtcactggga gttcggcgat gcggctacca cccgtgtcct cgcagcctcg
26161 tgcattgget cctactgcta cctgatgac gaccgtccag agggcctgtg ccttgagcgc
26221 atggagtca cgcaacacac catcgactat tccatcgagc cttaccggac ctacatggac
26281 atgaagaaga ccatcgttct cgggtcttac aacatcgaca cgaacctgac ttcgttcgac
26341 gttcggactg cctacgggtg aacgccgggg cctgagtcca cgtctacac catcgaccaa
26401 caaggggttc tcatcgaaca cgaggcgcgg gactgggcga ccaatccgta catctcgttc
26461 gtgggcaacc gagctggtga gcagatggtg atcggcaagc agtacacgtt ccagtacgag
26521 ttcagcaagt tctcatcaa gcagaccgt gacgatgggt ccacctgac cgaggacatt
26581 ggacgcttgc agtccctcg tgcgtggctg aactacgagg aatctggtgc cttcagatc
26641 aacgtcaaca acggctccag tgagttcgtc tacgtgatga ctggtggtcg cctcgggatt
26701 caacgagtc tcggtgagtt gtccgtgggt actggtcagt tcaagttccc tgtgaccgac
26761 aatgccgta accaacgagt caccattacc agtccaacc cgaacctact caacgtgatc
26821 ggatcggct ggggaagtaa ctacatccgc cgttctccg gcatctaaca gtgaccaagt
26881 gggggcctca aaaacctca ctatggcacc ctatgagggt ttcttatga tcttgacaca
26941 agcaaccaag cgtgacctg aggaagcagc aggcaatctt tcgttcgtg atctcaaga
27001 attcattcc cacaccagtg ggcgcgatcc atccgagaca cttctgcct gccttgacga
27061 gaccacgatg gtcacaaagg tgggcgctt ggttctggcc gttggtggct ccaagaattg
27121 cctgtggttc gtgacacca atgtgtcca gtcgctgacc aagggacaac ggatcgcctt
27181 ctacaagctc ctgcatggac acctcaaggg tctccgtgac agtgggcacc aatacctgac
27241 caactcgtg tcggtcgata actgggacca tatccgctt ctcaactcac tcggggctgt
27301 cttcctaag gagcacacca tgagccagc cggatgctgg ttccgtaat tctggctata
27361 ggaggtgagc tatgtcgaa ccagtatcca tcggcatggc cgctgtgcc ctcgtgggtg
27421 gactatggc tgcgcagat aagtcgaagg ctgagggtgc cgctgaggac gcccaacgtc
27481 gatctgccg tgagcagtc aagcagatga acatggcaa tgccaacctg aacctcaacg
27541 ctcaggaaa ggcagacgag gcccgtaagc agctcgtga ggtcaacatg caggccctgc
27601 gaaaccaagg gaccatccgc accgctatcg gtgagtcggg tctctcaggg aactccatga
27661 agcgattgc gaactccgc gagaacgaag cgagccagca gcgcatgtcc atcactgaca
27721 actaccaccg cgactaccag tcgatcttg cgaaccagat tgccaacacc gagaacacca
27781 agagcgcct caaggtcaa gcgcaggtca tcaagacctc gggcctgtc aacgtctggt
27841 gcatcatctc gtcgggtgcc aatgggtacg tccaagggtc gaaccttcg agtgccatga
27901 agggcagctc ggcgggtggt tctaacggca caccagcagg aggtaagacc taatggcaaa
27961 cgatatttcc agagcggtag accagtcccg cttcgggtgc actgagcagc tccacgggtc

28021 cactgcgacc actcagttcc aagcgtccat ccaacgggca cctgtgggtt ccacgggtct
28081 cgctgaggcc atgcagcagt tcgtcaagtc gggcagtgca gccttcggga cgtacaccga
28141 gcagcgccaa aagacagccg atgagaggtc caacgagatc atccgcaagc tgaccctga
28201 gcagcgccgt gaggcaatcg ccaacggcac cttgctgtat caggatgacc cgtatgcgat
28261 gaacatgctg cgccagaagt cgggtcgctc tgcggcctac gatgtcgagg atgaaatcca
28321 gaccaagctc aacaatggtg agttcgatgg gaaggaccgt aagtacctc aagaataccg
28381 ccagcagcgt ttggctcagt ctgcgaagtc ctatgcggaa tctgcgggca tcgacgagaa
28441 cgacctgag taccaagcgg ggttcaactc ggacatcgtt cagcggaacg cgggtatcta
28501 cgacctgac gctcgtcgtc gctctgctg gttccagtct caacaggctg tgaacacccg
28561 tggcgatctg gctccgttc tggacgatcc caatgtgatg cactcgcctt cgggcggtga
28621 ggtcatctc ggctactca acaacggctt gcagaacggt tcctcccca gcgacaagca
28681 ggccattgat tccctctcga tgctcgttaa ggacgtgcaa cagaaggacg gtggcaccaa
28741 cctgctcgc tctctcgtg accagacgat caacgttctg ggtgggtcca agaaggtcgc
28801 tgacctgatt gacctgaca tctacgagaa cgccatcgcg caatccgagg cgaacgagta
28861 caagcgctat cagagccgca cccgtgagtt cgagctgggc atcactacgg ccatcaatca
28921 ggagaaccct gagaccggct ggcggatgct ccaagacctg cgggcgaaga acggctggct
28981 ccaaggttcg gacaacatga ccctcagaa gcagaagctg attgacgctg agcagcacat
29041 gatcggcatg gttcgccagc aatcccaagc gaccgccaag gagacccaaa aggcatcca
29101 aggggacgct cgtgttggt acctgaagca gcagtacgag gctcgaatca gtggccagaa
29161 cgtgtctgtc gatcccaagt tccaaccgga catcgggtcg ggcgagtgga aaggcgtgga
29221 cgcaatgacc gctccaacg agatcatgct tgacatctcc aagtcgaatc tcctgacaa
29281 cgtgaaggac gccaaagcgt ctgcatacct tcgtgctgac tatcagggcg gtccattcca
29341 gacctactac caagcgctca tctactgacgc ccagcgggaa tggaacaact cgggtcgtc
29401 tggcgagccg ggtgacatga ctcgaatcac tgagctgcaa cgtgcctatg cggctgacc
29461 agcgaccatc ggttcggtct acccagagca ggctgacttc ctcgaaaaga tgaaggacat
29521 ggctgactca ggcgctgacc cgagcgtgtt gattgccgct gagaaggcca ccaagaacat
29581 gagcatcgac gagcgcaagt tccgtgacca agcgtgggct gatctgaa ga acgattccag
29641 cgccaaggac ctgacctctc taccgggtcc ccttgagcgg atcgtcggga ctctctacga
29701 cggttacaac gagcgcactg gcaacgcca gcaggcccaa cagaaggctct ctgagtggct
29761 ccagaagaac accgttgcgt tcaccagga tcaaggtggg gtcttctcag gaccagacca
29821 agggacgctc cgtggccgtc tctcgaagaa agccctcatg gctgaccag cggacgttaa
29881 ctcgtggcag ggcggtcaga gcatcgtcga ggacacctg aagggcctc ctgagaacce
29941 tcaatgggcc gacaccggga tgaccgtgga aggcaccgac tctggggaca tcgttatcag
30001 ctcgctcaac ggcaagcggg tacgcattac ccagcagcag atgcaactga tctacaaggc
30061 tcgccaagca gcagcggctg agcagaagtt caacgagaag aaggaatcgg tgaagaccgg

30121 ccagttctc tacaacgacg taatccgagg gggccgtggc cctctctaac aggaggtcta
30181 catgaaccgc aaagacgaat acgccaagct ggtagcagaa ggcaccccat acgacgacgc
30241 aattcgtcag gcagcagatg ccaatgggggt ccctatgag tacctgcaca agaagatttt
30301 catcgagtcc agcttcaacc ctgacgcaa gtcgccaacc ggacctctgg gtctgggcca
30361 gttcaccaag gcgaccggca aggettacgg gctgatgacc gatgaggatc gcctggacce
30421 aatcaagtcc atcaacgctt ccgctcagta cacccgtgac ctcatgggca cctacaaggg
30481 cgacatgctg aaggctcgtc tggcctacaa ccaaggcaac ggctgtctgg gtgctccca
30541 gttggccgcg ctggatcgtg gggacttctc caagatcagc catgagggtg cccagtacat
30601 ggccaacctt ctggacgtag cgggcgactc tccgaaccgt aagtggftc atgggaaatcc
30661 ccaagcccca aagctcaact ctgacttga gcaaacacc aacggggta gacaccagcc
30721 aaagggtgtg ccggaactc ccgagtcga gggcttcaac cttgccctcg gggatgctc
30781 taaagtccaa ccaacgttcc gcgagatgga gatcgaccag aacgggccag agaagggcgc
30841 atgggacaac acatgggatg ccgtaagtc gtccctattg accagctcc cgctcagat
30901 cgctcggaac atcaccgtc aggaccatga cccgtggac tgggtgaagc ccggtgacac
30961 ctgaaactgg aacgatcagg acttcgagaa catccgcaag gaagggatc accctcaata
31021 cttcgcttc atctcact acaccaaggg cagccgtgac aagctcccag aggcaatcgc
31081 cttggcgaag gagaacgtg attatgatc tcggatcggc aaagctggct gggctggtca
31141 actgaccgtt ggcacgtc gtgtgtctt ggaccctctg acctacgtt ctgtcccg
31201 tgggtctggt gcctcgtc ctgcccgtgt tggcaagcag gctgcctca gttcggccat
31261 gtcggtcggc tctgaggctc tgcgcgagca ggccactgt atcgaagcc actatcggc
31321 tgctctgta ggtggtgccg tgatcgggtg tgcggctct gctctctgg acaagttcat
31381 tgccaaggct gctgtctctg gccgtctga tatggccgat gcggacatgg aagctgtact
31441 ggctcggcac ggcgaagctg gtctgcctaa ccgtgacgtg gagttgcctg aaggtatggc
31501 acctgtcaa cgcaagccgg aagatggtga gatggacgat gactatctgg agaagattct
31561 gggctccac ggtgagcga gccacaagca ggaaggctt aagacaatgg ccgacgatc
31621 cgttgagtc atccttgcg gccacgtga gtcgtctgag ccgaacgagt tctatggccc
31681 gaccagtcgc ctgcaagccc gtgaggctgc tcgccaagct ggtgtggacg atccaacccg
31741 tatgccgatc aactccgat atgccctga ggacttcaat ggggtgctct atcggacaa
31801 ccccggcgag cgtggtcgg ttcgtctgc agatggctc atcctgtctg gtagcaacc
31861 gctcaatccg aagaccaaca agctggccgc tgagatcgg cctgatcgtt ccgcaaaagg
31921 gttctccctt gggcgatca ctgagatcgg ctacaagctg aatcgtctg aggacgtga
31981 cgtgctggac atcggctga agctgtccg ttccacggg cagaccgaga gtgctccaa
32041 tggacgttc gcggctacc ctcggacat cattgagcgc ctgctggtg aggacaacct
32101 gtcttatgg aagctcaac acctactga gagctcctg aagaacgacc cgaagtatgc
32161 cggtatggat ggtcgaagg tggccctgat ggagcgtgcg tctcgtcgc tggcggaaag

32221 tatecaggac tcaacgaacg ccaagaaggc catgctgagc aagcaggagc gtgagctgat
32281 ggaccacatc aacgagcact tcaactcga gacgagcgtg ttgaaaaacc ctgcccagtt
32341 cggcaacgct caggcgaccg ctgtgctgga ccagagccga cacgctggcc actacgtgcc
32401 taacgtctat gacgatgctg cccgtgcgct gtacctgaag aagttcggtg gtgctgacgg
32461 cctgcaacaa ggcatcaagt cgagctggct ggcgtcctac gcttcccgcg ctactgtcaa
32521 ggctcgggtg gacaagtca tcaaggaagc aatcgagaag gaaggcaagg tggcaacgcc
32581 tgagctgac gccacgctg tcgagcgcta cgccatgac aaggcatac gcatctcga
32641 cactcaggac ttcaaccgtt cgacactgat cgacgatgtt cttgattcgc tgggggtgc
32701 tgagaacaac aacttcctcg aagcccgtaa cctgttcgac tcggacgtgt cggctcctct
32761 gagcgatggc tcgtcgttct cggtaacga cctgcgatg tatgactca ccaagctgat
32821 gccatctat gaccgccgta tcaacggtga cgtggggatc atggctcga ctggtgaagg
32881 cactgatgcg ctcaaggctc gtatcctgaa gctcaagacc accaagggca acagctctga
32941 cgtggaggcc cttgagtctg ccgtaagct gctcactggt cgcgctcgtc gtaaccaga
33001 tgacgcctt gggactgctc tgcgatccct caacgacctg tccttctca ccaagaacgc
33061 ctacatgggc gtgcagaact teaccgagat cgccgggatg gtgaccaatg ggcattctg
33121 gatgctgatg cacggtgtgc cttacctgcg tgagatgacc acttggggaa ccaagatcaa
33181 accagagcag ctcaaggaga tgcacaacct gatcttcggg cgagaactgg atgacacat
33241 ccggctcgt cgggctgaca tcgtggaccg tctgcccacc caaggctcga acaactcgt
33301 tgcccagacc gtaggctctg ccaagttcgc cactcaggaa ctggccgctc gcagtccgtt
33361 caccaagctg ctactgaga ctccaacta catcgtgac gctggtcgtc aaggtgctct
33421 gatggacatg atccgagctg ctatgggga cactccgaga atcctcactg acaaggagct
33481 gcatgcctg tcgatacca agcaacagtt cggtgacatc aagcaagcga tcaaggaaca
33541 catcgtccct gacggtgatg gctcaagat caaggaccg gctgccctgc gcagtgacc
33601 acggacaatg gatattggc ggatcggta caagatcgt gacgagcga tctgcgtcc
33661 acacaagctg tctctcagg actctcgtc tctgggtgct ggctggcaca tggcattgca
33721 gttcaagaa ttcgtctca ggtccctaa cggtcgctc atgcgggca tctacactc
33781 caccaagaat ggccggggca tcgacttcgc tattcaagg gtcgtcga ctggcctcgc
33841 aacgggctt ttcgtggcgc aacgtacgt gcaggtcag ggtatgccac cagagcaacg
33901 caaggactt ctcaagaact cttcacgcc agagatgctg ggctgggca gcagtccccg
33961 taacaacatc ctggtgctc caatcgaggt ggccaactt gtgctcgtc cactgggta
34021 cgaccggct gctgctgtc gtacctcgtt cctcccaga ggccctgagt tcgtcgtaa
34081 ggatgtcca gtgcgttact cgcctcctc ttcggatggt gttcagcgtc cactgagcgg
34141 ccttctggag cagattccgg gtgccggtat cctcgggtca gcctaccaag taggtcga
34201 cgctgaaggt atctggaag acactcggc ctccaagag ctgggctaca tgaccggcat
34261 ttacaatgga ctgctggcc tcgtgcaaaa cgatccagtc tcgcaacgtg ctcttagcgc

34321 catgatgcag gaagcaggta tggaaataccg cacccgctaa aaccctcac tatggcacc
34381 tcaacggctc acttcggtgg gccattttt taaggagacg atatggctac tacaccaag
34441 acggtgcgga cctacgctct cgatggcacc aagaaagact tcacgatccc ctfcgagtat
34501 ctcgctcgga agttcgtgt ggtcaccttg atcggtgcaa ctcgacgtga gctgatcctg
34561 aacaccgagt accgcttcac taccaacacg accatcacca cgaccaagge atggggaccg
34621 gctgacaact tcgacctgat cgagattcgc cgactgacct ctgcaactga gcgtctggtg
34681 gacttcgctg atggttcgat ccttcgggccc tacgacctga acatctcgca ggttcaatcc
34741 ctgcacatcg ctgaggaagc ccgtgacctg accgctgaca caatcggcgt gaacaacgat
34801 ggtgacctcg atgcccgtgc ccgtaagatc gtcaacctcg ccgatggcgt gaacgatggt
34861 gatgcggta acctgcgcca gcagaaacaa tgggcaaggct ctgcgttgaa ctctgcgacc
34921 gccagtgcgg ccagtgcggc tgcctctgag gcgtcccgtc aggcttctt ggctcaggcc
34981 aatgcgagcg ctacatctgc tgttcaatcc tctcagttca aggatcagtc ctctacttc
35041 agaatgagg ccgagggttt ccgcaaccaa gctgctgcat ctcgggactc tgcctccgca
35101 agcgagacca atgcttccca atgggctgcc aaaccggaag accaagtgtt ctctgggagt
35161 ctctattcgt ctaccacta cagccgaaag agtgctgcga gtgcctctgc gactgcaacc
35221 tctcgggca acgctgcgaa ctcttgacc caagtgcc aacagtaac tctggcgacc
35281 gctcaggctg accgtgcgaa gaccgaggct gacaagctgg gcaactcaa cggctcgtc
35341 ggagcttgg attctgtatc gggaaccact gtgacgtgga aaggtaacca gatcagcaag
35401 actgggggat tcatctcccg gtctgactct gaggcgaact tcacttcca gaaggctgac
35461 ggctccgac ctatccgtct tgcctgaca gcagaccgcg cagttcatct ctatggtgac
35521 gcatcgggtg acggtgatcg aatcgtctg tactccactg gcgtgacgat tccgaagacc
35581 ctgactatca gcggcacgac gttcactcag gctatctcca cctctggaaa tatcatcctg
35641 acaggtagcg tacttgcggc tggcaactg caggccaaag gcggcaacct tcaggctac
35701 gctgctgctt ccaacgaaa ctcccacgtc tggttctaca actctgatgg ggcgaccga
35761 gggattctct acggtgttac tgacaacgca atgcggctcc aagcgggcaa cagtgtatgt
35821 gcgacgttta ctgctgatgg tggctgaaac ttcaacaaca tcaacgaaa cgccatcgga
35881 atcaccgctg gtggcgtcca gtcgatcatg tacgaaggtt ctggcatctc tctggctcc
35941 tacggccaat gccagtgca gctccaaggc actggtggtg gtgtggccaa gctgggcttc
36001 cacaacgctg gccgagtggc tctgacctt tggctgaccg acaacaacga actccagatc
36061 atgaagaact ctggggcgaa caccgagatc atccacaacg gcaacctcgg ggcatggaac
36121 gttccgcga tctccgtga agtgattggc caactgtcgt tcttcagaa cgtctctggg
36181 tgaacctcg attccaactc gcagctcgtt ggcggcaacc ttccggaagtc cactcaaac
36241 aacgtgagcg gggcaccggg tggacttgg cgtctatgg gctggtccaa caacggcggc
36301 gttccatct ggcaacgtgt cgcttaacca ataggagacc ttatggaatt cccgaagact
36361 tacgactcgg gctgacat ctggggcgtt cttcgcct catggacaga cgtgagaaa

36421 atccgcatca actgcgcat caaggtgaa ctcaaggatg cctctgggga accagtggta
36481 gaagaatggc ccttcacggc ctgcccttgg gacacctcg gtccgactg tctgaaatc
36541 ttccgtcacc tcgctgaagg tgggtctggt ccggtagctg agtgggtccg cctgaaagtg
36601 accgtggccg atctgcaagc cgagttgac cgtatctggc ccgacgtggc gctgggtctg
36661 gccgatcagg caaccatcga cctcgtaag aatctgcgcg tcagatcaa ggcgatgagc
36721 tgatggctgg ccttgagatc gacttcacca acggggtggt tcgctgctcc cctatcgccg
36781 ctggagctgg tgctgaagta gcaagccaag tggcaggcat gacgctgagc gattggttct
36841 acgccacat catcctctac accatctgac aacgttctg gctggtctc aagaccgta
36901 tggacgagaa gcgcaagaac aaaggagacc caccatgagt gacaacgtc tggaaaagt
36961 gctggaggca atcgacaccg agaccgctc tgcctcctg agcgacctc gtgatgacga
37021 ccgtcgtca cctcaactgt acaacgcat cggcaagtac cttgagctc acaagttcac
37081 catcgccaag ctgaagcccg atgagtcct tctggcgat ctggccgctg ccctcaacga
37141 gttccctgag ctgggtgagg atgagctgta cggtagcga gtgcgccact aatgggctc
37201 aaggagatcg cattggcagt cgttctggt gctggtgcc tcggtctggc ctacacaaag
37261 ggtaactccg atcgaccga caccctgaca atcaaacacc aagcggaaact actggccgct
37321 aacagacaac tggagggtga acgtgaaca gcccaacaaa ccatcgagc catctccaag
37381 gactggcaag gctatctcgg ttcgagcaag gcatctgctg atcgctgtg ggctgatctg
37441 cgcagtcgca atatgggct gtcagtcaa ctcgcagatg cgaccgtccg gtgcgtcaca
37501 agcgacggtg gaccctccc tgatggtcga gccgaactac gaagcgactt tcttcagct
37561 cttatcgagc aagcccagc agcagacgcc caagtgaagg gccttcagaa aaccgtaaga
37621 gactgcaag gaggtaa gta atgtcgaac cccgcaatgg ggccgacgat ctggagctga
37681 ttaaaaggtc atctgtggc tttctttt tctgtggag ggcactgaac ctacccaac
37741 cgactaatg ccagatcgac atggccaaga aactgagcgc cggtagcag cgccgttta
37801 ttctcaagc attccgaggt atcgggaagt ccttcacac ctgtgcctc gtggtgtgga
37861 agttgtgaa caaccagac ctcaagtta tgatctgtc cgttccaag gaacggcgag
37921 acgccaacag cgtgttcac aagegaatca tcgacctgct cccattcctt cacgagctga
37981 agccgggtcc gggtaacgt gacagctctc tcgcttcga cgtgggtcct gccaaagctg
38041 accactgcc ctctggaag tctgtaggta tcaccgtca gttgactggt agccgtgctg
38101 acatctcat tgcggacgac gttgaggtc ccaacaactc tgccactcag accgcccag
38161 atcacctcgg agagctggtg aaggagttc atcgatcct gaagccgggt ggtacgatca
38221 tctatctggg aaccctcag accgagatga cctctaccg cgagctgga ggcctggat
38281 acgtcacaac gatctggcct gcgagatacc ctaaagacca agctgactgg gactctatg
38341 gccacggct ggtcctatg ctggctgctg agctacaggc agatggtcc ctgtctggg
38401 caccgactga cgaggtcgc ttcgatgaca aggacctc tgagcgggaa ctgtctacg
38461 gcaagggtgg ctgcactt cagttcatg tcaaccgaa cctctccgac atggagaa

38521 accctctcaa gctgcgtgac ttcacgtag ggacgttgc tcaggacaag ggaccaacca
38581 ccctcatctg gatgccaac gctgccaac g agtgcaagg cgttcctgtg gtgggtctga
38641 aaggtgaccg ctccaccgc tacgaatccg ttgtcaagc cactgcgagc tacgctcaga
38701 aaatcctgt gatcgacccc tggggcgtg gtaaggatga gaccggctac gctgtgctgt
38761 accaactcaa cggetacatc ttctgatgg acgctgggtg ttccgtgtg ggctacgagg
38821 aactgttct ccaagcgtg gccaacatcg ccaagattca caaggtcaat gagatcgtc
38881 ttgagggcaa ctccggtgac ggtatgtaca tcaagctgct ggccctgtg gtcaccgcta
38941 cgttccctg tgcgatcact gaggtaagt ccaagggtca gaaggaactg cgcactcgcg
39001 acgttctgga gcctgtactg ggagccaca agctggatc ccaagagagc ctctttaga
39061 aggactaccg gacagctctc aacgctgacg gcaccactga cacgtctac agcctcctg
39121 accagctcac tcggatcacc cgtgagagag ggtcactggc tcacgacgac cgtctcgatg
39181 ccctcgccat tggcgtcag ttcttactg aggcccttga gagagactcg aaggtgggtg
39241 agtcggagat gctgcaagag ttctttaga gccacatgga ggacgcctg atgggtcacg
39301 accggctgct ggagatgctg atcagcgaag gctgtc gat ccagtacgag gacgatggct
39361 caatgaccaa ttacatgggc tggtaaggac tctgcaagat cgcagcaaga tcgacgaaga
39421 tttaaaacc ctactatgg cccagagagg ggggtatct catagataaa cttagagact
39481 ctgcacgatc cctacaaggt aggttctc tgcagtgtt ctccctcgac caattcaaca
39541 gtgattatca acaaggagg taaggccatg accgtggaga gagcactgt gctgctcgtc
39601 ttaaagegcc ttgccctctc tcggccacc tacaagctca tcggtctct gctcgtcacc
39661 ttcgggtgg caagtggtag tgatgtatg agctgggtct ccaccctct gtgcgtggcc
39721 tctggcggat gcgggtactg acgtcaatt tcggcagggt taacacccta cctcattgag
39781 ccataagagc aaggctaac gttccctaa ctggtctcca taggatgcc ttagggat
39841 cgttaggtct accgataga tggcactgc atgaaccgt gggttacc ataggatgacct
39901 ttaagaatct gacagaaaa tctgaaagg cacctctcaa ggacaacagc cgagagttcc
39961 cccgtaggg cctctcaagg atgatecata ggaacctct cccggtgacc tctgagtgag
40021 atcgctcgg ttccctcaag ggcactcat ggggatcatt atgggctact caaggagggt
40081 tggccaattg ggaatctcaa tgggttca tggggat

//